

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**DOCTORADO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD
EN BIOTECNOLOGÍA**

**CONVERSIÓN BIOTECNOLÓGICA DE ASERRÍN DE PINO EN
AZÚCARES FERMENTABLES**

Por

Javier López Miranda.

**Como requisito para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA**

Diciembre, 2008

EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO 1-4 DEL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS-UANL, EN COLABORACIÓN CON EL LABORATORIO DE POSGRADO DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA DEL INSTITUTO TECNOLÓGICO DE DURANGO.

BAJO LA DIRECCIÓN INTERNA DE LA DRA. KATIUSKA ARÉVALO NIÑO

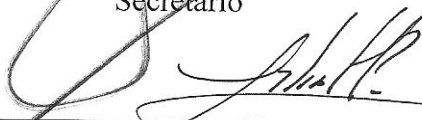
**CONVERSIÓN BIOTECNOLÓGICA DE ASERRÍN DE PINO EN
AZÚCARES FERMENTABLES**



Dra. Katiushka Arévalo Niño
Director de la tesis



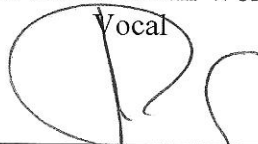
Dr. Hiram Medrano Roldán
Secretario



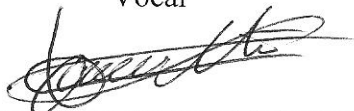
Dra. Lilia H. Morales Ramos
Vocal



Dr. Luis J. Galán Wong
Vocal



Dr. Benito Pereyra Alférez
Vocal



Dr. Nicolás Oscar Soto Cruz
Asesor externo

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi sincero agradecimiento a la Dra. Katiushka Arévalo Niño, quien Dirigió el desarrollo de la investigación, por su invaluable apoyo, paciencia y calidad profesional y humana. A la Dra. Lilia H. Morales Ramos, al Dr. Luis Galán Wong, al Dr. Benito Pereyra Alférez, al Dr. Hiram Medrano Roldán y al Dr. Nicolás Oscar Soto Cruz por formar parte del Comité de Tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo económico otorgado.

A la Dirección General de Educación Superior Tecnológica y al Extinto COSNET, por el apoyo económico que hizo posible la realización del trabajo experimental.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León y al Instituto Tecnológico de Durango, por permitirme el uso de sus instalaciones y equipo.

Al Gobierno del Estado de Durango y al Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Durango, por desarrollar, impulsar y apoyar el programa de formación de cien doctores, de los que formo parte.

A la Dra. Olga Miriam Rutiaga Quiñones y al Dr. Aquiles Solís Soto su apoyo y valiosas sugerencias durante la redacción del documento.

A todas las personas que contribuyeron, de una forma u otra, a la realización de este trabajo.

DEDICATORIAS.

Dedico el presente trabajo a mis padres Ernesto López Castañeda y Juana Miranda Uriostegui, que, aunque no alcanzaron a compartir conmigo este momento de victoria, estoy seguro que se sentirían orgullosos de ella.

A mi esposa, Noelia Gómez Serrano, por su apoyo en el trabajo práctico, por su amor, paciencia y comprensión, que me han sostenido e impulsado a lo largo de ésta aventura.

A mis Hijos Javier Ernesto, Nohelia e Ibeth Zaharaii, a quienes animo para que continúen por el camino de la preparación y el esfuerzo.

A mi Nuera Blanca Rebeca y a mis yernos Héctor Hugo y Arturo, quienes se han integrado a mi familia y a quienes quiero como a hijos.

A mis nietos: Miranda Rebeca, Diego Arturo, Blanca Desiré, Italia Victoria, Hugo Sebastián y Frida Sofía, a quienes amo y por quienes continúo en la lucha diaria.

A mis hermanas Margarita, Eulalia, Angélica, Laura, Edith y Ernestina, por haber crecido conmigo, por ser mis amigas y porque estoy seguro se alegran conmigo por este logro.

A mi suegra Consuelo y a mis cuñadas Elba, Hortensia, Silvia y Carolina, porque comparten mis alegrías y sufrimientos.

A Jehová mi Dios y Señor y a Jesucristo, su hijo, en quienes creo y a quienes dedico toda obra de mis manos. Gracias por permitirme vivir ésta vida, en esta época.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS.....	iv
DEDICATORIAS.....	v
LISTA DE TABLAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
NOMENCLATURA.....	x
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUCCIÓN.....	14
2. HIPÓTESIS.....	16
2.1. Justificación.....	16
3. OBJETIVOS.....	18
3.1. Objetivo general.....	18
3.2. Objetivos específicos.....	18
4. ANTECEDENTES.....	19
4.1. Etanol combustible.....	19
4.2. Biomasa lignocelulósica.....	23
4.3. Las enzimas celulolíticas.....	32
4.4. Madera de pino.....	33
4.5. Métodos de pretratamiento.....	36
4.6. Optimización estadística.....	38
5. MÉTODOS.....	41
5.1. Muestreo y acondicionamiento de la muestra.....	41
5.2. Composición química del aserrín.....	42

5.3.	Elección del método de pretratamiento.....	42
5.3.1.	Pretratamiento alcalino.....	43
5.3.2.	Explosión con vapor.....	44
5.3.3.	Pretratamiento ácido.....	45
5.3.4.	Comparación de métodos.....	45
5.4.	Hidrólisis enzimática.....	46
5.5.	Efecto de las variables de hidrólisis.....	47
5.6.	Identificación de variables a optimizar.....	47
5.7.	Optimización del proceso de sacarificación.....	47
5.8.	Fermentabilidad de los azúcares obtenidos.....	49
6.	RESULTADOS.....	51
6.1.	Composición química del aserrín.....	51
6.2.	Elección del pretratamiento.....	52
6.2.1.	Pretratamiento alcalino.....	52
6.2.2.	Explosión con vapor.....	53
6.2.3.	Pretratamiento ácido.....	53
6.2.4.	Comparación de métodos.....	54
6.3.	Efecto de las variables de hidrólisis sobre el rendimiento de sacarificación.....	55
6.4.	Identificación de variables de optimización.....	57
6.5.	Optimización del proceso de sacarificación.....	60
6.6.	Efecto del contenido de lignina sobre el rendimiento de sacarificación.....	63
6.7.	Fermentabilidad de los azúcares producidos.....	65
7.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	67
7.1.	Composición química del aserrín de pino.....	67
7.2.	Elección del método de pretratamiento.....	67
7.3.	Influencia de las variables de hidrólisis sobre el rendimiento de sacarificación.....	69
7.4.	Efecto de la combinación de variables de pretratamiento e hidrólisis, sobre la eficiencia de sacarificación.....	70
7.5.	Optimización del proceso de hidrólisis.....	70
7.6.	Efecto del contenido de lignina sobre la eficiencia de sacarificación.....	71
7.7.	Fermentabilidad de los azúcares obtenidos.....	72
8.	CONCLUSIONES.....	74
9.	LITERATURA CITADA	76
10.	RESUMEN BIOGRAFICO.....	84

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Propiedades del etanol combustible.....	20
2. Propiedades de los combustibles metanol, etanol y gasolina.....	21
3. Composición química de algunos tipos de biomasa.....	25
4. Efecto combinado de las variables de pretratamiento e hidrólisis enzimática sobre el rendimiento de hidrólisis. Condiciones experimentales.....	48
5. Hidrólisis enzimática del aserrín de pino pretratado con NaOH.....	52
6. Hidrólisis enzimática del aserrín de pino pretratado por explosión con vapor.....	53
7. Hidrólisis enzimática del aserrín de pino pretratado con H ₂ SO ₄	54
8. Rendimientos de hidrólisis obtenidos con los pre tratamiento probados..	55
9. Efecto de las condiciones de hidrólisis sobre el rendimiento de sacarificación del aserrín de pino pre tratado con NaOH en las condiciones seleccionadas.....	56
10. Efecto de las variables de pretratamiento e hidrólisis sobre la sacarificación enzimática del aserrín de pino pretratado con NaOH.....	57
11. Efectos de interacción entre las variables de pretratamiento (CNAOH, tp y TP del pretratamiento, con las variables E, th y pH de la hidrólisis).	59
12. Región experimental en la dirección de la trayectoria de optimización para las variables NaOH, tp y th. Primera aproximación.....	61
13. Diseño 2 ³ factorial con punto estrella alrededor del cambio de tendencia.....	61
14. Región experimental en la dirección de la trayectoria de optimización para las variables NaOH, tp y th. Segunda aproximación.....	62

LISTA DE FIGURAS.

Figura	Página
1 Proceso de transformación de la biomasa lignocelulósica en Etanol.....	22
2 Diferencias morfológicas y estructurales entre la paja de trigo ¹ y la madera de pino blanco ²	24
3 Estructura de la biomasa lignocelulósica.....	25
4 Estructura de la celulosa.....	26
5 Estructuras de las principales hemicelulosas de las maderas Suaves.....	28
6 Estructura química de la molécula de lignina.....	30
7 Principales monolignoles hidroxicinamilicos precursores de la lignina.....	31
8 <i>Pinus duranguensis</i>	36
9 Composición química del aserrín de pino en base seca.....	51
10 Gráfica de superficie de respuesta que muestra el comportamiento de los rendimientos de hidrólisis alrededor del segundo cambio de tendencia.....	62
11 Curvas de nivel.....	63
12 Influencia del contenido de lignina residual en el aserrín pre tratado sobre el rendimiento de hidrólisis enzimática de su contenido de celulosa.....	64
13 Contenido de lignina en el aserrín pre tratado, en las condiciones establecidas por el diseño central compuesto.....	65
14 Fementación de los hidrólizados obtenidos con las condiciones óptimas de pretratamiento e hidrólisis.....	66

NOMENCLATURA

Ar	Azúcares reductores (% m/m)
ANDEVA	Análisis de variancia
CBHI	Celobiohidrolasa I
CBHII	Celobiohidrolasa II
CM	Cuadrado medio
DEC	Dominio de enlace de la celulosa
Desvest	Desviación estándar
DMS	Diferencia mínima significativa
DNS	Ácido Dinitro-salicílico
E	Concentración de la enzima (UPF/g)
Et	Concentración de etanol (g/L)
F	Estadístico para la prueba de F.
FSS	Fermentación y sacarificación simultáneas
G	Concentración de glucosa (g/L)
GL	Grados de libertad
H ₂ SO ₄	Concentración de H ₂ SO ₄ (% m/v)
Lr	Contenido de lignina residual (% m/m)
LIC	Límite inferior de control
LSC	Límite superior de control

MCD	Método de conversión directa para la conversión de azúcares a etanol
N	Concentración de levaduras (células/mL)
NaOH	Concentración de NaOH (% m/v)
R _H	Rendimiento de hidrólisis (% m/m)
t _h	Tiempo de hidrólisis (h)
T _H	Temperatura de hidrólisis (°C)
t _p	Tiempo de pretratamiento (min)
T _p	Temperatura de pretratamiento (°C).
UPF	Unidades de papel filtro.
Y _{p/s}	Rendimiento producto/sustrato.

RESUMEN

El creciente problema de contaminación ambiental, las exigencias modernas de combustibles limpios y renovables, la abundante diversidad de biomasa lignocelulósica, su limitado aprovechamiento y su composición química compleja, han orientado la investigación, en el campo de los biocombustibles, hacia el desarrollo de tecnologías que permitan la recuperación óptima de los azúcares contenidos en este tipo de materiales. Por otra parte, la madera de pino es un recurso natural renovable, muy abundante en el norte de México. Su explotación genera una cantidad apreciable de desperdicios con escaso o nulo valor comercial, cuya disposición constituye un serio problema para la industria forestal nacional. Por lo anterior, el presente trabajo pretende encontrar las condiciones de proceso, que permitan la conversión biotecnológica del serrín de pino en azúcares fermentables, susceptibles de ser convertidos en etanol. Para ello se determinó la composición química del aserrín, se compararon los métodos de pretratamiento ácido, alcalino y explosión con vapor, se eligió el pretratamiento alcalino porque produjo el rendimiento más alto de azúcares reductores, se determinó el efecto combinado de las variables de pretratamiento e hidrólisis sobre los rendimientos de azúcar, se optimizó el proceso de sacarificación elegido y se evaluó la fermentabilidad de los azúcares producidos, en las condiciones óptimas encontradas. Los resultados muestran que el aserrín de pino está constituido por 26.58% de lignina, 20.41% de extraíbles, 0.68% de cenizas y 52.33% de carbohidratos. El pretratamiento con NaOH produjo rendimientos de hidrólisis tres veces mayores a los obtenidos con los pretratamientos ácido y explosión con vapor. Las variables que influyen significativamente en el proceso de hidrólisis enzimáticas son, la concentración de NaOH, la temperatura y el tiempo de pretratamiento, el pH y el tiempo de hidrólisis. Las interacciones entre estas dirigieron la optimización del proceso hacia las variables: concentración de NaOH, tiempo de pretratamiento y tiempo de hidrólisis. Los valores óptimos encontrados para estas variables fueron: 240h para el tiempo de hidrólisis, 8.24% para la concentración de NaOH, y 86.6 min para el tiempo de pretratamiento. El contenido de lignina en el material pre tratado, en condiciones similares (7.87% de NaOH y 84.38 min de tp), fue de 26% y el rendimiento de sacarificación en las condiciones óptimas fue de 68%. Lo anterior evidencia la estrecha relación que existe entre el contenido de lignina y su estado de agregación con la facilidad de hidrólisis enzimática de la celulosa contenida en la biomasa lignocelulósica. La fermentación de los azúcares obtenidos en las condiciones óptimas, se realizó con una cepa autóctona de *S. cerevisiae*, durante 60 h. Durante la misma se consumió el 68% de los azúcares alimentados y de estos, sólo un 11% se convirtió en etanol. Por tanto se concluye, que las condiciones óptimas de operación, para la sacarificación enzimática del aserrín de pino son: 8.24% de NaOH a 120 °C por 86.6 min y para la hidrólisis son: un pH de 4.5, con una carga enzimática de 25 UPF/g de holocelulosa, durante 240 h. La baja fermentabilidad muestra la necesidad de identificar apropiadamente las condiciones de fermentación.

ABSTRACT

The growing problem of environmental contamination, the modern exigencies for clean and renewable fuels, the abundant diversity of lignocellulosic biomass, its limited uses and its complex chemical composition, have oriented the investigation, in the field of the biofuels, towards the development of technologies that allow the optimal recovery of the sugar content in this type of materials. On the other hand, the pine wood is a renewable and natural resource, very abundant in the north of Mexico. Its exploitation generates an appreciable amount of wastes, with little or null commercial value and whose disposition constitutes a serious problem for the national forest industry. For instance in this work it is postulated that it is possible to use pine sawdust like raw material for the fermentable sugar production, susceptible to be turned to ethanol. In order to demonstrate the previous thing, in the first place, the chemical composition of the sawdust was determined, the methods of acid, alkaline pretreated and by vapor-explosion was compared, the best method was chosen, using as a like main criterion, the sugar yield, the combined effect of the pretreatment and hydrolysis variables, on the sugar yields was obtained, the chosen process of saccharification was optimized and the fermentability of produced sugars was evaluated, in the found optimal conditions. The results show that the pine sawdust is constituted by 26.58% of lignin, 20.41% of extractable, 0.68% of ashes and 52.33% of carbohydrates. That the alkali treatment with NaOH produced the highest hydrolysis yields (three times greater than the thrown ones by the other methods). The variables that influence significantly in the enzymatic hydrolysis process are, the concentration of NaOH, the temperature, the time of pretreatment, pH and the time of hydrolysis. The interactions between these directed the optimization of the process for the variables: concentration of NaOH, time of pretreatment time of hydrolysis. The found optimal values were: 240h for the time of hydrolysis, 8.24% for the concentration of NaOH, and 86.6 min for the time of pretreatment. The content of lignin in the material pretreated in the optimal conditions was minimum (26%), whereas the yield of saccharification in the same conditions were maximum (68% m/m). The previous thing demonstrates the narrow relation that exists between the content of lignin, its state of aggregation and the facility of enzymatic hydrolysis of the content of cellulose in the lignocellulosic biomass. The fermentation of obtained sugars, in the optimal conditions, with a native stock of *S. cerevisiae*, during 60 h, consumed 68% of the fed sugars, which, only an 11% became ethanol. Therefore one concludes, that was obtained the optimal conditions for the enzymatic saccharification of the pine sawdust (8.24% of NaOH to 120 °C by 86.6 minutes and one hydrolysis to pH of 4.5, using an enzymatic load of 25 UPF/g of holocellulose, during 240h) and that, the low fermentability of these, only shows the necessity to make more intense studies, than they allow to identify, appropriately the conditions of fermentation

1 INTRODUCCIÓN

La escasez potencial de petróleo, el aumento en los niveles de CO₂ atmosférico, el calentamiento global del planeta y la necesidad de aprovechar los recursos lignocelulósicos renovables que se producen y desperdician en el mundo, han estimulado la búsqueda de tecnologías que permitan el aprovechamiento de estos últimos, en la producción de combustibles alternos para el sector transporte. Debido a sus propiedades combustibles y su capacidad antidetonante, los esfuerzos se han orientado principalmente hacia la producción de etanol. Éste se utiliza en la formulación de gasolinas oxigenadas en Brasil y Estados Unidos, quienes actualmente son los principales productores y consumidores de etanol en el mundo. Estos países utilizan a los azúcares contenidos en la caña de azúcar y del maíz, respectivamente, como principales materias primas para la producción de etanol. Lo anterior ha ocasionado desabasto (sobre todo de maíz) y una fuerte presión económica a nivel internacional. Sin embargo, el etanol también se puede producir a partir de la biomasa lignocelulósica, una materia prima heterogénea, abundante, renovable y poco utilizada. La producción de etanol a partir de la biomasa lignocelulósica, puede disminuir la dependencia energética del petróleo, mejorar la calidad del aire, controlar los desperdicios agrícolas, forestales, industriales y municipales, generar nuevos negocios y oportunidades de empleo, abrir nuevos mercados para los productos de desecho y nuevas oportunidades económicas

para las tierras subutilizadas, además de estimular el crecimiento del sector rural. Sin embargo, para poder utilizar a la biomasa lignocelulósica como materia prima, es necesario resolver el problema que implica la liberación de los azúcares contenidos en ella, ya que se encuentran formando parte de largas cadenas de celulosa y hemicelulosa, cuya estructura y composición, depende de su origen. Para la recuperación de estos azúcares, es necesario realizar pretratamientos severos, costosos y agresivos para el ambiente. Lo anterior justifica los esfuerzos de investigación que continúan realizándose en el campo de los biocombustibles, para el desarrollo de tecnologías apropiadas que permitan el aprovechamiento de los diferentes tipos de biomasa disponibles en las diversas regiones del mundo. En México recientemente (Noviembre de 2007) se está promoviendo la producción de etanol combustible a partir de biomasa lignocelulósica. Debido a ello y considerando que los recursos maderables del país constituyen una fuente importante de biomasa, de la cual se genera un volumen considerable de desperdicios (1, 346, 000 Ton de aserrín por año), con un elevado contenido de carbohidratos (80%), que si se aprovechan es posible producir a partir de estos hasta 568,000 Ton de etanol por año. Por lo anterior, el presente trabajo presenta los resultados obtenidos para el establecimiento de las condiciones de proceso que permitan el aprovechamiento biotecnológico del serrín de pino, como materia prima para la producción de azúcares fermentables susceptibles de ser convertidos en etanol combustible.

2 HIPÓTESIS

La estructura y composición química de la biomasa lignocelulósica es compleja y depende de su tipo y origen. La obtención de azúcares fermentables a partir de la biomasa producida localmente depende del empleo de procesos de pretratamiento severos, tales como el ácido, el alcalino y la explosión con vapor, así como del conocimiento los valores óptimos de las variables de pretratamiento e hidrólisis, tales como el tipo y concentración de catalizador, la temperatura, el tiempo, el pH y la carga enzimática. También se requiere del conocimiento de la influencia que estas variables tienen sobre la fermentabilidad de los azúcares generados, por microorganismos conocidos, tales como *Zymomona mobilis* o *Saccharomices serevisiae*. Considerando por otra parte que el aserrín de pino es un recurso lignocelulósico importante para el norte de México y que se desconocen las condiciones de pretratamiento e hidrólisis para su aprovechamiento, el presente trabajo postula que es posible utilizar este material como materia prima para la obtención de azúcares fermentables susceptibles de ser utilizados en la producción etanol, a condición de que se conozca el mejor método de pretratamiento y los valores óptimos de las variables de pretratamiento e hidrólisis.

2.1 Justificación

El aserrín de pino es un subproducto de la industria forestal mexicana que actualmente se desperdicia y que constituye un serio problema de contaminación del

suelo en que se deposita. Éste es un recurso que puede ser utilizado para la producción de etanol combustible, que al mezclarse con la gasolina, además de aumentar su octanaje, puede contribuir a la reducción de la concentración de CO₂ atmosférico y a la solución del grave problema que representa el calentamiento global del planeta. Sin embargo, el pino es una madera suave, cuya estructura es más rígida y su contenido de lignina más elevado que el de las maderas duras o los residuos agrícolas, por ello, es más difícil de hidrolizar por métodos enzimáticos. Como consecuencia, el aserrín de pino debe ser sometido a tratamientos más severos, con ácidos, álcalis o explosión con vapor, a fin de modificar su porosidad y mejorar la eficiencia de su hidrólisis enzimática. El rendimiento global de etanol producido a partir de los materiales lognocelulósicos, como el aserrín de pino, depende del rendimiento de azúcares fermentables, pero también de su fermentabilidad, de la concentración de enzima, del origen de la misma y del tiempo y temperatura de hidrólisis. Por lo tanto, la elección del método de pretratamiento y el establecimiento de las condiciones óptimas para su realización al igual que el conocimiento de las condiciones de hidrólisis enzimática, son determinantes para lograr los rendimientos de azúcares fermentables más altos posibles.

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Desarrollar un proceso biotecnológico que permita la conversión enzimática del aserrín de pino, en azúcares fermentables susceptibles de ser utilizados en la producción de etanol combustible.

3.2. Objetivos particulares

- 3.1.2.1 Seleccionar un método de pre-tratamiento que permita la producción eficiente de azúcares fermentables.
- 3.1.2.2 Identificar la influencia de las variables del pre-tratamiento y la hidrólisis, sobre la eficiencia de sacarificación enzimática del aserrín de pino.
- 3.1.2.3 Optimizar el proceso de producción de azúcares, seleccionado, utilizando el método de superficie de respuesta.
- 3.1.2.4 Evaluar la fermentabilidad de los azúcares generados, utilizando para ello, el proceso de producción de etanol.

4. ANTECEDENTES

4.1. El etanol combustible

El etanol es un alcohol líquido que se está usando como combustible automotriz, debido a que su combustión no produce emisiones de CO, disminuye las emisiones de CO₂, SO₂ y óxidos de nitrógeno los cuales contribuyen a la formación del ozono urbano. También disminuye las emisiones de compuestos tóxicos, como el benceno, tolueno, xileno, tri-metil-benceno y partículas PM10, que son partículas con diámetros menores a 10 micrómetros (Atev *et al.*, 1983; Farone y Cuzzens, 1996).

Para utilizarse como combustible automotriz, el alcohol debe ser anhidro (99,5 °GL), y debe mezclarse con la gasolina en proporciones inferiores o iguales al 20%, para evitar modificaciones al diseño de los motores (Atev *et al.*, 1983; Farone y Cuzzens, 1996; Gramajo *et al.*, 2004). En las tablas 1 y 2 se muestran las propiedades combustibles y antidetonantes del etanol, respectivamente.

El etanol se puede producir a partir de substratos lignocelulósicos, mediante métodos de conversión directa (MCD), (Kumar *et al.*, 2007) y procesos de Fermentación y Sacarificación Simultaneas (SFS) y de Fermentación y Sacarificación Separadas, (Wingren *et al.*, 2003). La producción de etanol se realiza generalmente en cinco etapas (Figura 1). En éstas se distinguen como variables críticas la concentración de enzima, la composición del complejo celulasa y la actividad enzimática específica de sus

componentes (celobiasa, endoglucanasa y celobiohidrolasa I y II), la velocidad de dilución, la concentración de alcohol, la velocidad de crecimiento de las levaduras y la inhibición de éstas por el etanol. De acuerdo con Philippidis y Hatzis (1997), para el desarrollo del proceso SFS, será necesario poner especial atención a los métodos de pretratamiento, a la producción de preparaciones de celulasa de alta actividad específica (bajo costo por unidad de enzima) y al desarrollo de organismos capaces de fermentar tanto hexosas como pentosas. Además, de acuerdo con Desai y Converse (1997), es necesario generar turbulencia, para mejorar la eficiencia del transporte de los polímeros solubilizados desde la interfase sólida hasta la fase líquida.

Tabla 1. Propiedades del etanol combustible¹.

Propiedad	Comentarios
Densidad del vapor	El vapor de etanol es más denso que el aire y tiende a asentarse. Sin embargo, se dispersa rápidamente.
Solubilidad en agua	El etanol combustible se mezcla con el agua, pero cuando ésta se encuentra a concentraciones mayores al 0.5%, el etanol se separa de la gasolina.
Contenido de energía	El etanol contiene menos energía por unidad de volumen que la gasolina, porque el carbono está más oxidado.
Visibilidad de flama	La flama del etanol es menos brillante que la de la gasolina, no obstante, es fácilmente visible a la luz del día
Gravedad específica	El etanol puro y las mezclas etanol-gasolina son más pesadas que la gasolina pura.
Conductividad	El etanol y sus mezclas son conductoras de la electricidad. En contraste con la gasolina, que es un aislante eléctrico.
Toxicidad	El etanol es menos tóxico que la gasolina o el metanol. En el etanol puro no están presentes compuestos carcinógenos.
Inflamabilidad	A bajas temperaturas (32 °F), el etanol es más inflamable que la gasolina, pero a temperatura normal es menos.

¹Guidebook for Handling, Storing and Dispensing Fuel Ethanol. U.S. Department of Energy.

Tabla 2. Propiedades de los combustibles metanol, etanol y gasolina¹.

Propiedad	Metanol	Etanol	Gasolina (87 Octano)
Octano ² (R+M)/2.	100	98-100	86.94
Valor de calentamiento (Btu/lb).	8,570	11,500	18,000-19,000
Equivalentes por galón .	1.8	1.5	1
Millas por galón.	55%	70%	100%
Tamaño relativo de tanque.	1.8	1.5	1
Presión de vapor (psi).	4.6	2.3	8.15
Punto de Ignición en aire (°F)	800	850	495
Gravedad específica (60/60 °F)	0.796	0.794	0.72-0.78
Calidad de arranque en frío	Pobre	Pobre	Buena
Razón estequiométrica aire/combustible (por peso)	6.45	9	14.7

¹U.S. Department of Energy. 2006. Handbook for Handling, Storing, and Dispensing E85. DOE-NREL. NEVC. 28 pp.

²El Research Octane Number (RON) simula el funcionamiento del combustible para la operación del motor en condiciones de baja severidad y el Motor Octane Number (MON) simula la operación del motor en condiciones más severas, tales como alta velocidad o carga elevada. En la práctica, el octanaje de una gasolina se reporta como el promedio del RON y el MON o (R+M)/2

Por otra parte, el proceso de producción de alcohol requiere de la optimización de las variables cinéticas de las levaduras, en relación con el proceso empleado y mejorar la disponibilidad biológica de la materia prima a utilizar (Kosaric *et al.*, 1983). En la producción de etanol el rendimiento teórico es de 0.51 g de alcohol/g de glucosa, sin embargo, éste no se puede alcanzar, debido a que parte de los nutrientes se usan para la síntesis de biomasa y para otras reacciones relacionadas con el mantenimiento celular. Debido a ello, el rendimiento real se encuentra entre 46 y 49%. Los nutrientes y cofactores requeridos para la producción de etanol son: una pequeña concentración de

oxígeno (0.05 a 0.10 mm de Hg en el caldo), carbono, nitrógeno e hidrógeno, en menor cantidad se requiere fósforo, azufre, potasio, magnesio y minerales como Mn, Co, Cu, Zn, también factores de crecimiento orgánico como aminoácidos, ácidos nucleicos y vitaminas, en cantidades traza. Algunos nutrientes pueden suministrarse como sales de amonio y fosfato de potasio o a través de fuentes de bajo costo como el agua de cocimiento de maíz.

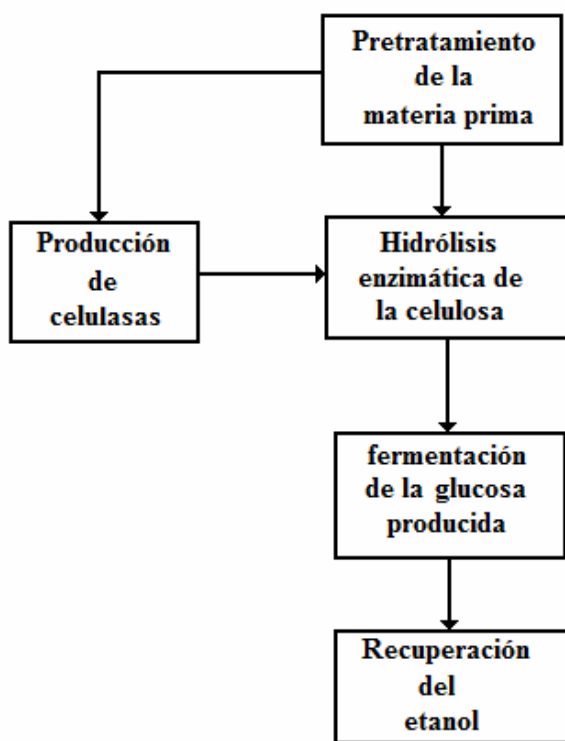


Figura 1. Proceso de transformación de la biomasa lignocelulósica en etanol (Philippidis GP and Christos H. 1997. Biochemical Engineering Analysis of Critical Process Factors in the Biomass-to-Ethanol Technology. Biotechnol. Prog. 13:222-231).

Las levaduras son muy susceptibles al etanol, concentraciones de 1 a 2% (m/v) son suficientes para retardar su crecimiento y cuando alcanzan el 10% (m/v), el crecimiento termina por detenerse. Aunque en fermentaciones largas, el alcohol etílico inhibe el

crecimiento de las levaduras por el mecanismo no competitivo de Michaelis-Menten, se ha demostrado que el etanol producido durante la fermentación, produce más inhibición del crecimiento celular que el adicionado desde el exterior (Novak *et al.* 1981; Hoppe y Hansford, 1982).

4.2. La biomasa lignocelulósica

Se conoce como biomasa lignocelulósica a toda la vegetación de la tierra y a muchos de los productos y subproductos que se obtienen de ella. La biomasa lignocelulósica se agrupa en cuatro categorías: residuos de madera, desechos sólidos municipales, residuos agrícolas y cultivos dedicados a la producción de energía (Wyman *et al.*, 2005). Su contenido energético es tal, que si se aprovecha, puede disminuir la dependencia energética del petróleo, además de mejorar la calidad medioambiental, controlar los desperdicios agrícolas, forestales, industriales y municipales, generar nuevos negocios y oportunidades de empleo, nuevos mercados para los productos de desecho, nuevas oportunidades económicas para el fortalecimiento de la economía rural (Klinton, 1999; Lynd *et al.*, 1999; Wyman, 1999; Demain *et al.*, 2005). La biomasa lignocelulósica está constituida esencialmente por los mismos componentes químicos (celulosa, hemicelulosa y lignina), pero la concentración de estos y la complejidad de su estructura, dependen tanto de factores genéticos como medioambientales (Lee *et al.*, 2007). En la Figura 2 se muestran dos microfotografías electrónica, una corresponde a la paja de trigo (Kristensen *et al.*, 2008) y la otra a la madera de pino blanco (Coté, 1980). En estas se aprecia la existencia de notables diferencias, sobre todo en el empaquetamiento de sus estructuras celulares (Wyman, 1999; Yang *et al.*, 2006), en

tanto que la figura 3 es un modelo generalizado que muestra la manera en que se encuentran estructurados los componentes de la biomasa. Como se observa, las fibras de celulosa se encuentran unidas a la lignina por medio de puentes de hemicelulosa. La celulosa da soporte y rigidez mecánica a la biomasa, la lignina soporta y protege a la celulosa de ataques químicos y biológicos (Barber y Mitchell, 1997) y la hemicelulosa une a la lignina con la celulosa (Lee *et al.*, 2007). De manera general, podemos decir que la biomasa lignocelulósica está constituida por 30-50% de celulosa, 20-40% de hemicelulosa, 15-25% de lignina y 35% de extraíbles (Lee *et al.*, 2007). En la Tabla 3 se muestra la composición química de algunos tipos de biomasa reportados en la literatura.

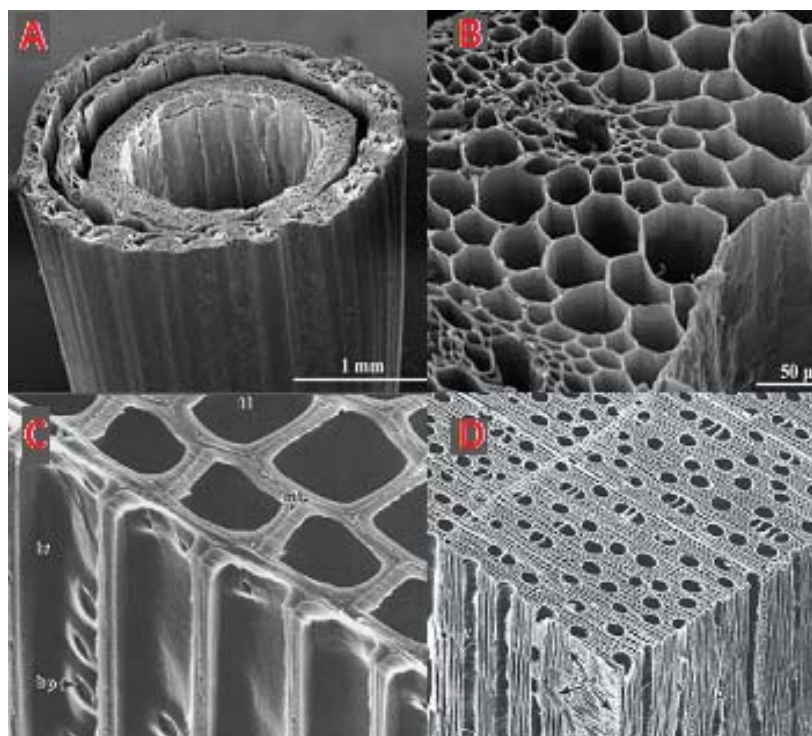


Figura 2. Diferencias morfológicas y estructurales entre la paja de trigo¹ (A y B) y la madera de pino blanco² (C y D). ¹ Kristensen BJ, Lisbeth GT, Claus F, Henning J and Thomas E. 2008. Cell-wall structural changes in wheat straw pretreated for bioethanol production. *Biotechnology for Biofuels*, 1:514 y ²Cote Wilfred A. 1980. Papermaking Fibers. Renewable Materials Institute of the State University of New York. Pp xxii-xxiii.

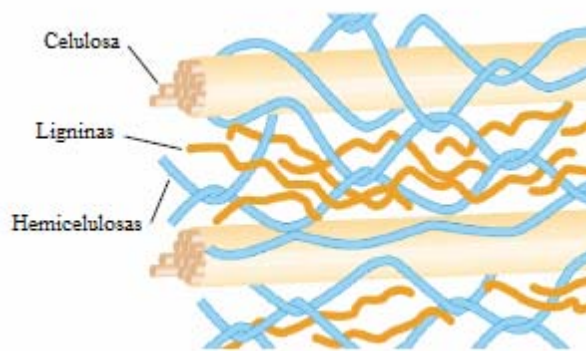


Figura 3. Estructura de la biomasa lignocelulósica, un complejo constituido por tres polímeros (celulosa, hemicelulosa y lignina). Como se observa, las fibras de celulosa están unidas a la lignina a través de puentes de hemicelulosa. Tomada de Boudet AM, Kajita S, Grima-Pettenati Jand Goffner D. 2003. Lignins and lignocellulosics: a better control of synthesis for new and improved uses. Trends Plant Sci 8:576–581.

Tabla 3. Composición química de algunos tipos de biomasa.

Material lignocelulósico	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)
Pino ¹	46.4	22.9	29.4
Picea ¹	49.9	20.6	28.7
Cáscara de nuez ¹	25-30	25-30	30-40
Paja de arroz ¹	32.1	24	18
Bagazo de caña	40.2	26.4	25.2
Switch grass ¹	31	24.4	17.6
Paja de trigo ¹	38.2	24.7	23.4
Pulpa de Abeto ²	82.8	8.1	0.6
Mazorcas ³	45	35	15
Paja de trigo ⁴	39.8	27.3	22.6

¹Wiselogel AE, Agblevor FA, Johnson DK, Deutch S, Fennell JA and Sanderson MA. 1996. Compositional changes during storage of large round switchgrass bales. Bioresource. Technology, 56:103–109. ²Esteghlalian RA, Mahina B, Shawn DM, and John NS. 2001. Do Enzymatic Hydrolyzability and Simons' Stain Reflect the Changes in the Accessibility of Lignocellulosic Substrates to Cellulase Enzymes? Biotechnol. Prog., 17:1049-1054. ³Saha CB, Loren BI, Michael AC, and Victor YW. 2005. Dilute Acid Pretreatment, Enzymatic Saccharification, and Fermentation of Rice Hulls to Ethanol. Biotechnol. Prog., 21:816-822. ⁴Kristensen BJ, Lisbeth GT, Claus F, Henning J and Thomas E. 2008. Cell-wall structural changes in wheat straw pretreated for bioethanol production. Biotechnology for Biofuels, 1:5-14.

La celulosa es un polisacárido lineal formado por residuos de glucosa unidos por enlaces β 1-4. (Mejía *et al.*, 2002). Las moléculas de celulosa tienen la tendencia a

formar enlaces por puentes de hidrógeno inter e intra moleculares; los cuales influyen en la reactividad de las cadenas y dan lugar a una estructura fibrilar de alta cristalinidad (Malcolm, 1999). La interacción entre las cadenas de celulosa da lugar a la formación de microfibrillas, con regiones cristalinas altamente ordenadas que le dan las características de insolubilidad, rigidez y resistencia al ataque enzimático (Mejía *et al.*, 2002) y con regiones amorfas (Figura 4), originadas por el rompimiento de los puentes de hidrógeno inter e intra moleculares (McLean *et al.*, 2002). La tasa de hidrólisis enzimática de la celulosa amorfa es de 3 a 30 veces mayor que la de la celulosa cristalina (Lynd *et al.*, 2002).

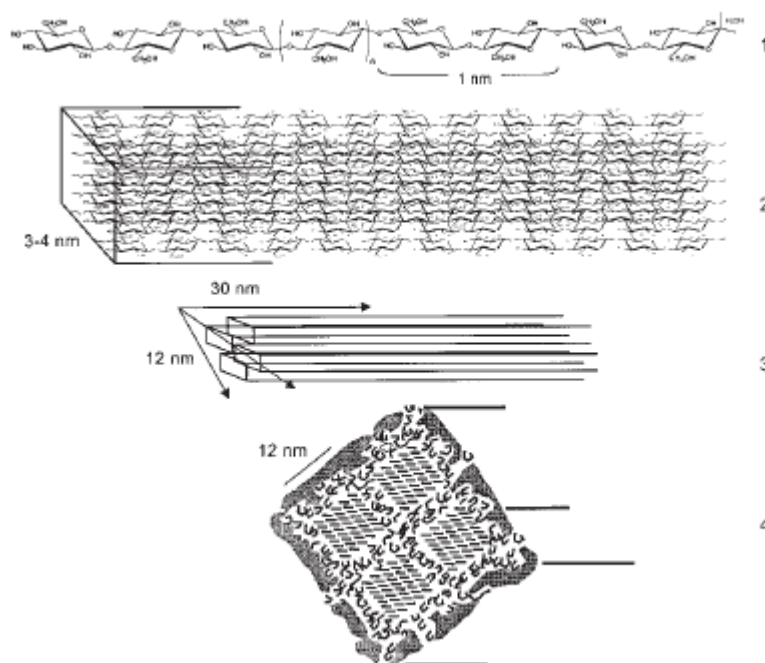


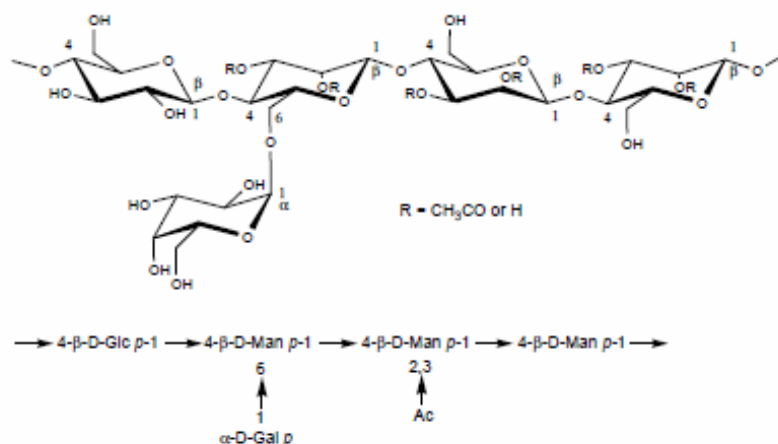
Figura 4. Estructura de la celulosa. Cadena de celulosa en la que se indica la longitud de la celobiosa (1), las cadenas que integran a la fibrilla elemental (2), los cristalitos de celulosa (3) y la sección transversal de la microfibrilla, mostrando los filamentos de las moléculas de celulosa encajadas en una matriz de celulosa y de protolignina (4). Tomada de Pereira RL. 2003. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. Quim. Nova, 26:863-871.

La celulosa cristalina presenta al menos dos estructuras halomorfas, la celulosa I y la celulosa II, ambas se sintetizan de manera natural en la naturaleza; sin embargo, la

celulosa I es más abundante que la celulosa II y es también la más estable desde el punto de vista termodinámico (Malcolm, 1999). La gran cantidad de enlaces por puentes de hidrógeno que mantienen unidas a las cadenas de celulosa no se rompen con el agua, pero los ácidos fuertes, los álcalis, las soluciones salinas concentradas y algunos reactivos complejos pueden humectar, dispersar, disolver o incluso romper las estructuras cristalinas altamente ordenadas de las cadenas de celulosa (Roncero, 2001). La unidad estructural de la celulosa es la celobiosa, sin embargo, el tamaño de la cadena de celulosa, está determinado por el número de unidades de anhidro glucosa presentes en una sola cadena y se expresa como el grado de polimerización de la celulosa (Pereira, 2003).

Por otra parte, las hemicelulosas (figura 5) son heteropolisacáridos complejos, cuya naturaleza varía de tejido a tejido y de especie a especie (Saha *et al.*, 2005), están constituidas por pentosas (xilosa, ramnosa y arabinosa), hexosas (glucosa, manosa y galactosa) y ácidos urónicos (Laine, 2002). Las hemicelulosas pueden ser de cadena lineal, ramificadas, helicoidales y pectinas (Pereira, 2003). En el modelo clásico, están ramificadas con cadenas laterales de azúcar que contribuyen a dar soporte a la pared celular de las plantas (McLean *et al.*, 2002). De acuerdo a este modelo, la hemicelulosa no cristalina, forma una matriz que rodea a las fibrillas de celulosa, llenando los huecos que se forman entre ellas y permitiendo su acoplamiento con la lignina.

Glucomananas



Xilanas

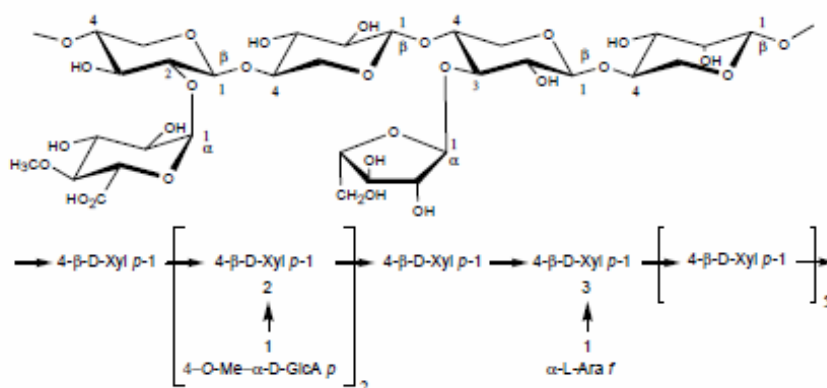


Figura 5. Estructuras de las principales hemicelulosas de las maderas suaves (Shimizu, K. 2001. Chemistry of hemicelluloses; in: Wood and Cellulosic Chemistry. Marcel Dekker Inc 2nd edition, New York, USA, pp. 177-214).

Recientemente se ha postulado que, durante la biogénesis de la pared celular, las hemicelulosas influyen en la trayectoria de agregación de la celulosa, regulando la estructura de la pared celular en sus niveles secundario y terciario (el nivel primario corresponde a la trayectoria de enlaces covalentes, el nivel secundario define las conformaciones de macromoléculas individuales y el nivel terciario la asociación de estas en agregados ordenados). De manera que, cualquier modificación en los niveles secundario y terciario de la pared celular, puede cambiar las propiedades de los enlaces

celulosa-hemicelulosa y modificar el ambiente molecular donde se localizan (Atalla *et al.*, 1993).

En cuanto a la lignina (figura 6), se puede decir que es, después de la celulosa, el polímero más abundante sobre la tierra. Contiene 1.5 veces más carbón que la celulosa y se encuentra formando parte de la pared celular secundaria de las células especializadas de los tejidos vegetales (Boudet, 1998; Liu *et al.*, 1999; Ramos *et al.*, 2001).

La lignina se ha definido a como un polímero de origen biológico derivado de los alcoholes coumárico, coniferílico y sinapílico (Figura 7). La proporción relativa de estos varía entre las distintas especies (Monties, 1994; Barceló, 1997; Boudet 1998) y aún entre diferentes tipos de células y tejidos de la misma especie (Whetten *et al.*, 1998). Esta definición de lignina es muy gruesa ya que existen muchas plantas que tienen cantidades considerables de otros componentes no usuales y al parecer, no existen plantas que contengan ligninas derivadas únicamente de los tres precursores primarios (Ralph *et al.*, 1998; Sederoff *et al.*, 1999). Debido a ello, para aplicaciones específicas, puede definirse a la lignina como la fracción de biomasa lignocelulósica cuyos componentes fenólicos no extraíbles, no pueden ser fragmentados o degradados para producir pulpa y papel. También puede definirse como un constituyente de la madera o pulpa, insoluble en ácido sulfúrico al 72%. A la lignina definida de ésta última forma se le conoce como lignina Klason (Ucar y Balaban, 2003).

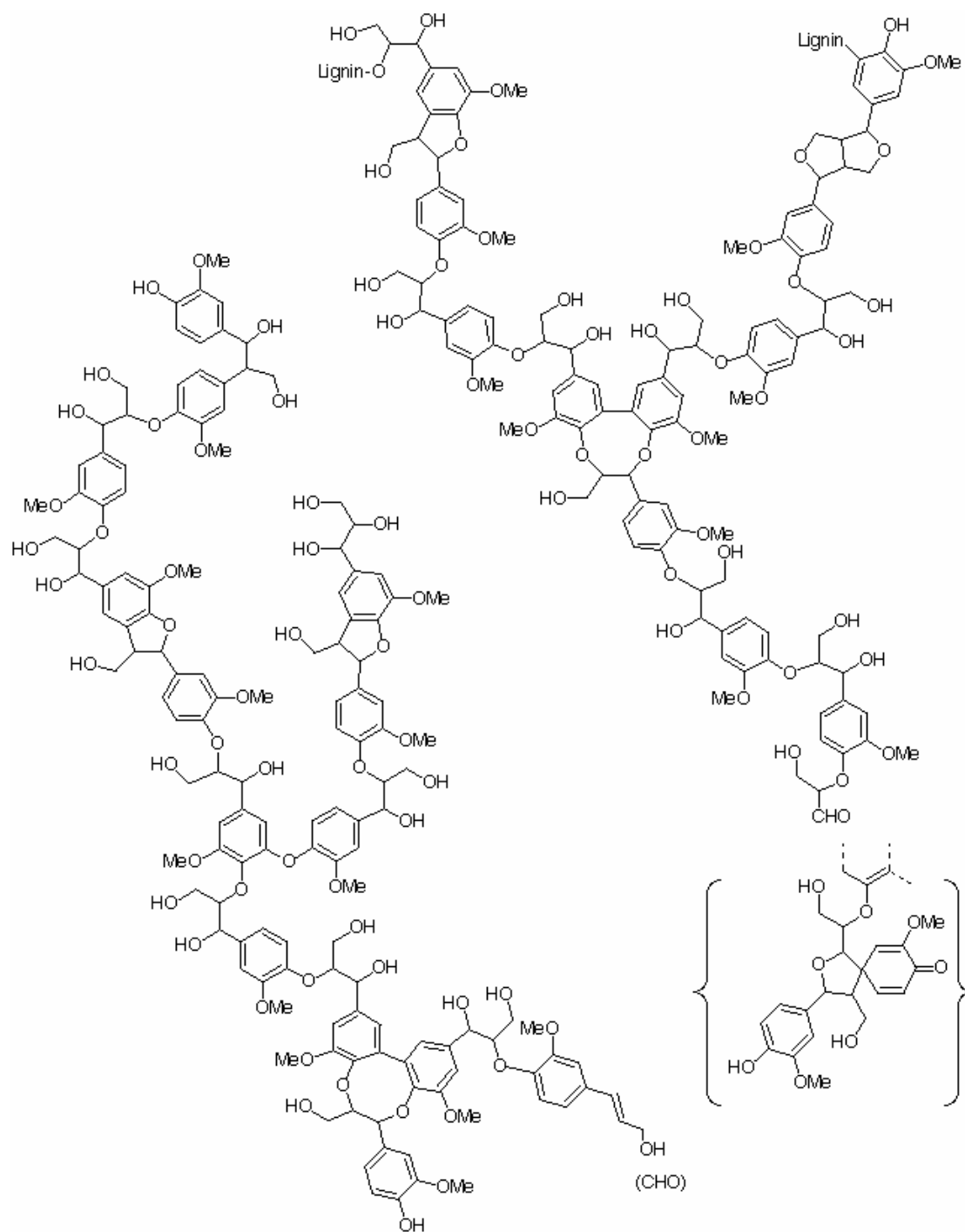


Figura 6. Estructura química de la molécula de lignina (Brunow et al., 1998. Oxidative coupling of phenols and the biosynthesis of lignin; in: Lignin and Lignan Biosynthesis, Eds. N.G. Lewis, S. Sarkanen, Am. Chem. Soc., ACS Symposium Series 697, Washington DC, USA, pp. 131-147).

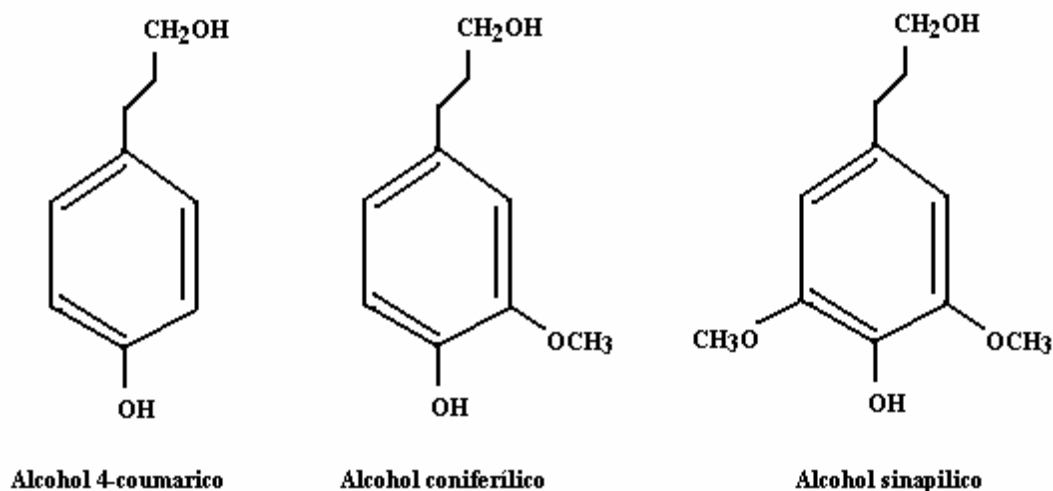


Figura 7. Principales monolignoles hidroxicinámilicos precursores de la lignina (Sjöström E. 1993. Wood Chemistry: Fundamentals and Applications. Academic Press).

En resumen: considerando que las hemicelulosas (a diferencia de la celulosa) se disuelven en álcalis fuertes. (Goldstein, 1989) y que, por su estructura amorfa y su bajo grado de polimerización, son más susceptibles de ser hidrolizadas por la acción de los ácidos minerales, más fácilmente que la celulosa (Goldstein, 1989; Fardim, 2004), las hemicelulosas se pueden separar del total de carbohidratos, rompiendo así la compleja estructura de la biomasa lignocelulósica y aprovechando las propiedades y usos de sus distintos componentes. Pero, como el tipo de biomasa y la región geográfica de su procedencia, influyen notablemente en su composición, y ésta es el factor más importante en el proceso aprovechamiento de su contenido de azúcares fermentables y por lo tanto del etanol combustible (Hamelink *et al.*, 2005; Hames *et al.*, 2003), son éstas diferencias las que justifican la investigación para la búsqueda de las condiciones específicas de operación para el fraccionado de los componentes de los distintos tipos de biomasa que se producen en las diferentes regiones del mundo (Wyman, 1999; Yang *et al.*, 2006).

4.3. Las enzimas celulolíticas

Las celulasas son enzimas producidas por una variedad de microorganismos, entre los que destaca el hongo filamentoso *Trichoderma reesei*, el cual produce dos celobiohidrolasas (CBHI y CBHII), ambas con una estructura modular formada por un dominio catalítico y un dominio de enlace (DEC). La finalidad de éste último es enlazarse a la celulosa. Aunque las afinidades de enlace de ambas celobiohidrolasas son aparentemente similares, el enlazamiento de sus dominios catalíticos al dominio de enlace de la celulosa difiere marcadamente (Carrard y Linder, 1999). Ambas enzimas son exoglucanasas, pero la CBHI actúa en el extremo reductor y la CBHII en el extremo no reductor de la cadena de glucana (Teeri, 1997). Se dice que las enzimas celulasas son procesivas, porque en 1997, Våljäme y colaboradores descubrieron que más del 70% de las moléculas de enzima encontradas sobre la superficie de la celulosa son móviles, que las velocidades de difusión superficial dependen de la superficie cubierta, que el empacado de las celulasas y sus dominios catalíticos sobre la superficie de la celulosa es un proceso dinámico, que la exclusión de sitios de enlace potenciales en la celulosa se debe a los efectos estéricos de los enlaces de la vecindad y que la tasa de difusión superficial no limita la actividad enzimática de la celulasa. Por otra parte, en 1999, Palonen y colaboradores encontraron que el enlazamiento de las celobiohidrolasas a la celulosa es un paso crucial para su hidrólisis, que la densidad de la proteína enlazada aumenta a medida que procede la hidrólisis, que las afinidades de la enzima dependen del enlace entre los dominios catalítico de la celulasa y de enlace de la celulosa y que las celobiohidrolasas difieren entre sí en la reversibilidad de su enlazamiento. Es importante

señalar que estos autores realizaron sus investigaciones sobre celulosa microcristalina obtenida de *V. ventricosa*, un alga marina cuya pared celular tiene una estructura multilaminar organizada de manera tal, que cada lámina se encuentra posicionada ortogonalmente a sus vecinas. Las láminas están constituidas por microfibrillas de celulosa ordenadas en forma paralela y las microfibrillas individuales son altamente cristalinas. Esta estructura difiere notablemente de la estructura de los sustratos lignocelulósicos complejos, no obstante, la explicación que dan estos autores, ayuda a entender la importancia del pretratamiento, dado que la eliminación de parte de la lignina y hemicelulosas que éste provoca, logra que los dominios de enlace de la celulosa (DECs) se descubran, haciéndolos disponibles al ataque de las celulasas, de esta forma, la aparición de los DECs depende, tanto de la variabilidad genética propia del material a hidrolizar, como de la severidad del ataque químico y del método de pretratamiento utilizado (Palonen *et al.*, 1999).

4.4. Madera de pino

La madera es una forma particular de biomasa lignocelulósica, constituida por células huecas y alargadas, arregladas paralelamente a lo largo del tronco del árbol. La dureza, la apariencia y la resistencia de la madera están asociadas con el espesor relativo de la pared celular y con la proporción de paredes delgadas y gruesas de sus células. Las células de las maderas duras están abiertas por ambos extremos para conducir la savia a lo largo del árbol, mientras que las células de las maderas suaves conocidas como traqueidos, son rectangulares, transportan la savia verticalmente y dan resistencia al

árbol. Contienen pequeños orificios transversales (pits), cuya función es almacenar y distribuir la savia horizontalmente.

La pared celular de la madera está constituida principalmente por celulosa, un polisacárido de hasta 4 μm de longitud (Schultz y Burns, 1990). Las moléculas de celulosa están arregladas en estructuras llamadas microfibrillas, de 10-25 nm de ancho, las microfibrillas se unen entre sí para formar macrofibrillas de 0.5 μm de ancho y 4 μm de longitud. Las macrofibrillas a su vez, están unidas con las hemicelulosas, las pectinas y la lignina. Las hemicelulósas constituyen entre 20 y 30% de la composición de la madera en base seca y difiere en características, estructura y forma en las maderas suaves con relación a las maderas duras. En las maderas suaves las principales hemicelulósas son galacto-glucomananas, mientras que en las maderas duras son xilanas. Además de esto, las cantidades y tipos de sustituyentes de las xilanas, difieren en las maderas duras con respecto a las maderas suaves. Sjöström, (1993). La lignina de las maderas suaves se conoce como guayacil-lignina y contiene más de 95% de unidades de alcohol coniferilico (4-hidroxí-3-metoxi-alcohol cinamilico) y los constituyentes remanentes son principalmente alcohol p-coumárico con cantidades traza de alcohol sinapilico, mientras que las ligninas típicas de las maderas duras se conocen como guayacil-siringil-ligninas, debido a que están formadas por unidades derivadas de alcoholes sinapilico y coniferilico (Kubo and Kadla, 2005). Las xilanas y la lignina se encuentran íntimamente asociadas y covalentemente enlazadas en la madera.

El análisis de lignina degradada sugiere que su degradación ocurre por un proceso que involucra una combinación de oxidaciones y reducciones (Tuor *et al.*, 1995). La estructura de la lignina residual en las pulpas kraft difiere significativamente de la que tenía en la madera y de la lignina kraft disuelta. Las pulpas kraft tienen menos lignina

que la madera y consecuentemente, la matriz del polisacárido que encierran es más porosa (Reid and Pice, 1994).

El género *Pinus*, es de gran importancia ecológica y comercial para México. Este género cuenta con más de 100 especies (Richardson, 1998) y es el más común dentro de la familia de las pináceas, la que a su vez, es la familia más grande dentro de las coníferales. El género *Pinus* es casi exclusivo del hemisferio Norte, ya que sólo una especie, *P. merkusii*, se extiende muy ligeramente al sur del ecuador. El número de especies varía ampliamente entre regiones, pero el principal centro de diversidad se localiza en México y América Central (Mirov, 1967). En México se conocen 48 especies, con 18 variedades y 2 subespecies, estas crecen en las cadenas montañosas de todo el país, desde los 300m hasta los 4,200m de altitud. Las especies más importantes de México son *Pinus leiophylla*, *P. hartwegii*, *P. montezumae*, *P. pseudostrobus*, *P. rudis*, (*P. michoacana*, *P. teocote*, *P. oocarpa*, *P. ayacahuit*, *P. pringlei*, *P. duranguensis*, *P. chihuahuana*, *P. engelmanni*, *P. lawsoni* y *P. oaxacana*. El *pinus duranguensis* (figura 8) es la especie comercial más importante para el Estado de Durango. En el 2003, la producción forestal de madera en rollo fue de 7 millones de m³, destacando Durango (31.1%), como el primero entre los principales productores: Chihuahua (20.5%), Michoacán (11.8%) y Jalisco (6.2%), (SEMARNAT, 2003).



Figura 8. *Pinus duranguensis*.

4.5. Métodos de pretratamiento

La tecnología para la producción de etanol combustible a partir de maíz y otros granos está madura y suficientemente probada, no así la tecnología para producir etanol a partir de biomasa, particularmente de maderas suaves, como la de pino, que se encuentra todavía en desarrollo (Lin y Tanaka, 2006). Sin embargo, el uso de aserrín, como materia prima, ofrece en el corto plazo un potencial económico muy importante para la producción de etanol (McCloy, 1999), sólo que para esto ocurra, se precisa del fraccionarlo de sus cuatro componentes principales: extractivos, celulosa, hemicelulosa,

y lignina (Jollez *et al.*, 1997), además de transformar a su contenido de celulosa en sus componentes monosacáridos (Åkerholm y Salmén, 2001 y 2002; Schultz y Burns, 1990; Marten *et al.*, 1996). Esta transformación puede realizarse mediante hidrólisis con ácido sulfúrico (Torget *et al.*, 2000) o por la acción concertada de enzimas celulolíticas (Mansfield *et al.*, 1999). La hidrólisis enzimática requiere que el aserrín sea sometido a un pre-tratamiento que facilite el ataque de la celulosa por el complejo enzimático, favoreciendo su transformación en azúcares fermentables (sacarificación), (Åkerholm y Salmén, 2001 y 2002; Schultz y Burns, 1990; Marten *et al.*, 1996). El pretratamiento, si es alcalino, puede romper la estructura cristalina de la celulosa y reducir su contenido de lignina, o puede hidrolizar a las hemicelulosas en azúcares simples, además de solubilizar parte del contenido de lignina del material (Åkerholm y Salmén, 2001 y 2002; Schultz y Burns, 1990; Marten *et al.*, (1996). Entre los métodos de pretratamiento que se han explorado destacan: la explosión con vapor (Cara *et al.*, 2008), el pretratamiento con ácido sulfúrico diluido (Schell *et al.*, 2003; Ojumu y Ogunkunle 2005) y el pretratamiento con hidróxido de sodio (Balaban y Uçar, 1999).

El pretratamiento con ácido sulfúrico diluido utiliza de 0.5 a 1.0% de ácido y temperaturas que oscilan entre 140 y 190 °C, produce una estructura porosa, más accesible a la acción enzimática (Wyman, 1994), remueve y recupera de manera efectiva a las hemicelulosas como azúcares disueltos (hasta un 90%) y permite la digestión casi completa de la celulosa (Hsu, 1996). Pero tiene como principales desventajas que requiere de materiales de construcción caros, presiones altas, neutralización del ácido y acondicionamiento del material antes de su hidrólisis enzimática, además, provoca que la digestión de la celulosa sea lenta, debido al enlazamiento irreversible de las enzimas con

la lignina residual (Wyman, 1999; Hsu, 1996; Oshima *et al.*, 1990). El pretratamiento por explosión con vapor, hace que las moléculas de agua penetren la estructura del material, para que la liberación abrupta de la presión en el sistema, haga que las moléculas de agua introducida, escapen explosivamente del material (Bender, 1979; Shimizu, 2001), rompan la estructura lignocelulósica, aumenten la accesibilidad de la celulosa al ataque enzimático e incrementen el rendimiento de glucosa (Bender, 1979; Tsao, 1987; Shimizu *et al.*, 1994; Gregg and Saddler, 1996). El pretratamiento con NaOH rompe los enlaces lignina-carbohidrato, remueve las hemicelulosas y parte de la lignina, abre la estructura del material, aumenta el área interfacial, reduce el grado de polimerización y cristalinidad de la celulosa, mejora su digestibilidad y favorece la acción hidrolítica de las enzimas. Este método es un fuerte candidato para la sacarificación enzimática de materiales lignocelulósicos (Soto *et al.*, 1994).

4.6 Optimización estadística

La superficie de respuesta es un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas útiles para modelar y analizar problemas en los que la respuesta de interés es influida por varias variables y el objetivo es optimizar esta respuesta. El diseño central compuesto y la superficie de respuesta son procesos que combinan métodos matemáticos con estadísticos. En experimentos multifactoriales, estos métodos permiten examinar varios parámetros con un mínimo de tiempo experimental, determinar los factores más relevantes, sus rangos de influencia y la interacción entre los mismos (Ge *et al.*, 2002).

La metodología de superficie de respuesta es una técnica secuencial cuyo propósito es guiar al experimentador de manera rápida y eficiente a las cercanías del punto óptimo. Una vez que se ha logrado esto, se puede emplear un modelo más elaborado, por ejemplo, una superficie de respuesta de segundo grado y realizar un análisis matemático del modelo, por el método de mínimos cuadrados, para localizar el óptimo. En la mayoría de los problemas de Superficie de Respuesta, la forma de la relación entre las variables y la respuesta se desconoce, por ello, el primer paso consiste en encontrar una aproximación apropiada, que permita la relación funcional real entre la respuesta y el conjunto de variables independientes. Por lo general se emplea un polinomio de orden bajo sobre alguna región de las variables independientes. Así, cuando la respuesta es descrita adecuadamente por una función lineal, de las variables independientes, la función de aproximación es un modelo de primer orden (ecuación 1).

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_k x_k + \varepsilon \quad (1)$$

Donde:

Y = variable dependiente o de respuesta.

X_1, x_2, \dots, x_k = variables independientes.

E = error estadístico, de naturaleza aleatoria.

B_0 = término independiente.

$B_1, \beta_2, \dots, \beta_k$ = coeficientes de regresión.

Cuando existe curvatura en el sistema debe usarse un polinomio de mayor grado, como por ejemplo, el modelo de segundo orden (ecuación 2).

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum_i \sum_j \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad i < j \quad (2)$$

Donde:

Y = variable dependiente o de respuesta.

X_i = variables independientes.

X_i^2 = efectos cuadráticos.

$X_i x_j$ = efectos de interacción entre variables independientes.

E = error estadístico, de naturaleza aleatoria.

B_0 = término independiente.

B_i = coeficientes de regresión de los términos lineales.

B_{ij} = coeficientes de regresión de las interacciones.

B_{ii} = coeficientes de regresión de los términos cuadráticos.

Una vez que se cuenta con el modelo, el método de mínimos cuadrados sirve para estimar los parámetros del polinomio de aproximación (Montgomery, 1991).

5. MÉTODOS

Se determinó la composición química del aserrín de pino colectado (holocelulosa, lignina, extraíbles y cenizas), se acondiciono por extracción con etanol al 95% y se sometió a los pretratamientos ácido, alcalino y explosión con vapor. Las muestras pretratadas se hidrolizaron con un concentrado enzimático comercial (Celluclast 1.5 L), bajo diferentes condiciones de concentración de catalizados (ácido o alcalino), temperatura y tiempo. Se eligió el método de pretratamiento que reporto los mejores rendimientos de azúcares reductores, Se eligieron las variables a optimizar y la optimización se realizó por el método de superficie de respuesta. Se midió la fermentabilidad de los azúcares obtenidos, empleando una cepa autóctona de *Saccharomyces cerevisiae*.

5.1. Muestreo y acondicionamiento de la muestra

En Durango existen 52 aserraderos, seis en la capital y el resto distribuidos en el estado. De los últimos se seleccionaron tres para la toma de muestras (Maderas Pinelli, Aserradero Halcón e Industrias Alfa), debido a que eran los que se encontraban trabajando regularmente. En dos de ellos las muestras se colectaron de los montones de aserrín generados durante una jornada de trabajo y en el otro se colecto la muestra

aleatoriamente de un montón generado durante años de trabajo. La cantidad de muestra tomada de cada aserradero fue de 30 Kg, aproximadamente. Las muestras obtenidas se atemperaron durante tres días extendiéndolas sobre mesas de acero inoxidable, se tamizaron y se recupero de ellas el aserrín que pasó por el tamiz de malla 20 y se retuvo en el de malla 40. Los tamizados se mezclaron cuidadosamente en igual proporción (tres kg de cada uno). La mezcla de aserrín se extrajo con etanol al 95 % durante 24 horas, utilizando para ello un aparato de extracción Soxhlet, se lavó con agua destilada, se secó a 60 °C durante 24 h y se almacenó a temperatura ambiente en recipientes de vidrio cerrados herméticamente. Éste material será denominado, aserrín libre de extraíbles.

5.2. Composición química del aserrín

Antes de ser extraído con etanol al 95%, el aserrín se analizó por cuadruplicado, para determinar su contenido de Humedad (Ehrman 1994a), Extraíbles (Ehrman 1994b), Cenizas (Ehrman 1994a) y Lignina (Templeton y Ehrman 1995). Su contenido de carbohidratos totales (holocelulosa) se calculó mediante la ecuación 3. Los resultados se expresaron como porcentaje en base seca.

$$\text{Holocelulosa} = 100 - (\text{humedad} + \text{extraíbles} + \text{cenizas} + \text{lignina}) \quad (3)$$

5.3. Elección del método de pretratamiento

Se probaron los métodos de pretratamiento con NaOH (alcalino), por explosión con vapor y con H₂SO₄ (ácido). Se determinó el efecto de las principales variables de

proceso para cada uno de ellos, los resultados obtenidos se analizaron por el procedimiento de análisis de varianza (ANDEVA) y los mejores resultados se determinaron mediante la comparación de medias por el método de diferencia mínima significativa (DMS). El método que produjo los rendimientos de azúcares reductores más altos se identificó por comparación de los mejores resultados de cada método, por el procedimiento de ANDEVA.

5.3.1. Pretratamiento alcalino

El pretratamiento alcalino se realizó con hidróxido de sodio. El propósito del experimento fue determinar el efecto de las variables de pretratamiento: concentración de hidróxido de sodio (NaOH), temperatura (Tp) y tiempo de pretratamiento (tp), sobre el rendimiento de sacarificación, para ello se realizó un diseño experimental 2^3 factorial. Los valores de las variables probadas fueron: 1 y 3% para la concentración de NaOH, 60 y 120 °C para la temperatura y 30 y 90 min para el tiempo. Los experimentos se realizaron por duplicado y los resultados se analizaron por los procedimientos de ANDEVA y DMS, con un nivel de confianza de 95%. Para realizar el pretratamiento se pesaron muestras de 10 g de aserrín libre de extraíbles en matraces Erlenmeyer de 250 mL, se adicionó a cada matraz 100 mL de NaOH (1 ó 3%), los matraces se sometieron a pretratamiento, bajo las condiciones anteriormente especificadas, posteriormente se enfriaron a temperatura ambiente y se filtraron en tela de nylon. El filtrado se lavó con agua destilada hasta un pH cercano a 7. Las muestras lavadas se exprimieron, se pesaron y almacenaron a temperatura de refrigeración en recipientes de vidrio cerrados herméticamente. Las muestras pretratadas se hidrolizaron, utilizando el procedimiento

indicado en el apartado 5.3, bajo las siguientes condiciones de hidrólisis: Una concentración de enzima de 25 UPF/g de holocelulosa, una temperatura de incubación de 45 °C, un pH de 4.5 y un tiempo de hidrólisis de 72 h.

5.3.2. Explosión con vapor

Se realizó un experimento unifactorial con tres niveles y dos repeticiones, con el propósito de determinar el efecto del tiempo de pretratamiento sobre los rendimientos de hidrólisis y determinar las condiciones de proceso que producen los rendimientos más altos de azúcares reductores. Para ello se pesaron muestras de 10 g de aserrín libre de extraíbles, se colocaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL. Se mezclaron con 100 mL de agua destilada, se taparon y dejaron en reposo durante 48 h a temperatura ambiente, se retiraron los tapones y se calentaron en autoclave a 120° C por periodos de 30, 60 y 90 minutos, se despresurizo la autoclave abriendo la válvula de alivio y, cuando la presión en el autoclave se equilibró con la atmosférica, se retiraron los matraces de la misma, se enfriaron a temperatura ambiente, se filtraron y se lavaron con agua destilada. Se exprimieron, se pesaron y se almacenaron a temperatura de refrigeración, en recipientes de vidrio cerrados herméticamente. La hidrólisis enzimática se realizó como se indica en el apartado 5.3. Las condiciones utilizadas para la hidrólisis fueron: Una concentración de enzima de 25 UPF/g de holocelulosa, una temperatura de incubación de 45 °C, un pH de hidrólisis de 4.5 y un tiempo de hidrólisis de 72 h. Los resultados se analizaron por el procedimiento de ANDEVA, con un 95% de confianza.

5.3.3. Pretratamiento ácido

El propósito de éste apartado consiste en probar el efecto de la concentración del ácido sulfúrico (H_2SO_4) y del tiempo de pretratamiento (tp), sobre el rendimiento de hidrólisis. Para ello se realizó un diseño experimental 2^2 factorial. Los valores de variables probadas fueron, para la concentración del ácido (1 y 2%) y para el tiempo de pretratamiento (40 y 120 min). Los experimentos se realizaron por duplicado a temperatura de autoclave (120 °C). En éste pretratamiento se pesaron muestras de 10 g de aserrín libre de extraíbles en matraces Erlenmeyer de 250 mL y se adicionó a cada matraz 100 mL de H_2SO_4 de concentración 1 ó 2%. Los matraces se calentaron a 120 °C, durante 40 ó 120 minutos, se enfriaron a temperatura ambiente y se filtró su contenido en tela de nylon. El filtrado se lavó con agua destilada hasta un pH cercano a 7. Las muestras lavadas se exprimieron, pesaron y almacenaron a temperatura de refrigeración en recipientes de vidrio cerrados herméticamente. La hidrólisis enzimática se realizó como se indica en el apartado 5.3. Las condiciones de hidrólisis fueron: Una concentración de enzima de 25 UPF/g de holocelulosa, a 45 °C, un pH de hidrólisis de 4.5 y un tiempo de hidrólisis de 72 h. Los resultados obtenidos se analizaron por los procedimientos de ANDEVA y DMS, con un nivel de confianza del 95%.

5.3.4. Comparación de métodos

Para la elección del mejor método de pretratamiento, se compararon los rendimientos máximos de hidrólisis obtenidos en los pretratamientos ácido, alcalino y

explosión con vapor, mediante los métodos estadísticos de ANDEVA y DMS, con un nivel de confianza del 95%.

5.4. Hidrólisis enzimática

Se pesaron 2.5 g de cada de la muestra pretratada húmeda, se colocaron en recipientes de plástico de 20 mL, se adicionó a cada frasco 2 mL de azida de sodio (0.1% m/v), se determinó la actividad del extracto enzimático comercial, por el método del papel filtro (Ghose, 1987). Se calculó el volumen de preparado enzimático requerido para obtener la actividad enzimática deseada, se adiciono la cantidad de buffer de acetatos necesaria para obtener una mezcla de reacción de 10g. Se pre incubó la mezcla a 45 °C y se adiciono el volumen calculado de solución enzimática. Los frascos se cerraron e incubaron a 45 °C y 70 RPM durante los tiempos indicados para los diferentes pretratamientos. Se preparo un blanco para el sustrato con buffer, agua y una cantidad idéntica de sustrato y un blanco para la enzima con buffer, agua y una cantidad idéntica de enzima. Concluida la hidrólisis, los frascos se agitaron vigorosamente y se centrifugaron durante 15 minutos a 5000 rpm. Del sobrenadante se tomaron alícuotas de 0.1 mL y se determinó su contenido de azúcares reductores por el método de Miller, (1959). El rendimiento de sacarificación, expresado como A_R (% m/m), se calculó mediante la ecuación 4.

$$A_r = \frac{\text{Azúcares reductores } \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right) \times 0.9 \times 100}{\text{Sustrato } \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right) \times \text{fracción de polisacáridos en el sustrato}} \quad (4)$$

5.5. Efecto de las variables de hidrólisis

Se probó el efecto del pH (4.5 y 6.5), la concentración de enzima (25 y 50 UPF/g de holocelulosa) y el tiempo de hidrólisis (72 y 168 h) sobre el rendimiento de sacarificación del aserrín de pino, el cual fue pre tratado con las condiciones que produjeron los mejores rendimientos de sacarificación, en el experimento anterior. Los resultados se analizaron por el procedimiento de ANDEVA ($p < 0.05$).

5.6. Identificación de las variables a optimizar

Se probó el efecto combinado de las variables de pretratamiento (NaOH, tp y Tp) e hidrólisis (th, E y pH), sobre el rendimiento de sacarificación, utilizando para ello un diseño experimental 2^6 factorial. Los valores de las variables probadas se indican en la Tabla 4. Los experimentos se realizaron por duplicado y los resultados se analizaron por análisis de varianza, con un nivel de confianza del 95%, utilizando el software Statistica, ver. 4.3.

5.7. Optimización del proceso de sacarificación

De acuerdo con estos resultados del experimento anterior se eligieron como variables a optimizar el tiempo de pretratamiento, el tiempo de hidrólisis y la concentración de NaOH. Se decidió trabajar a 120 °C, por ser la temperatura máxima alcanzable en el laboratorio. Como no afectó significativamente a la respuesta, se eligió trabajar con una carga enzimática de 25 UPF/g de holocelulosa, por ser el valor más bajo

utilizado anteriormente y se seleccionó un pH de 4.5 para la hidrólisis, porque la tendencia de optimización está dirigida en la dirección de menor pH, además, el valor de 4.5 es el menor valor del pH que garantiza la máxima estabilidad de la enzima, de acuerdo a lo indicado por el proveedor (4.5-5.5).

Tabla 4. Efecto combinado de las variables de pretratamiento e hidrólisis enzimática sobre el rendimiento de hidrólisis. Condiciones experimentales.

Factores	Nivel mínimo de variación (-1)	Nivel máximo de variación (1)
NaOH	1 %	3%
Tp	60 °C	120 °C
tp	30 min.	90 min.
th	72 h	168 h
pH	4.5	6.5
E	25 UPF/g	50 UPF/g

Factores y niveles de variación.

Para la optimización del proceso de hidrólisis se utilizó el método de superficie de respuesta (Montgomery, 1991). En primer lugar se realizó un ajuste lineal de los resultados (Ecuación 6). Una inspección del modelo muestra que la respuesta se mueve 0.80 unidades en la dirección de la concentración de NaOH y 3.02 unidades en la dirección del tiempo de hidrólisis (th), por cada 4.76 unidades en la dirección del tiempo de pretratamiento (tp). Con estas relaciones se definió la región experimental, en la dirección de la trayectoria de optimización. Los resultados de ésta primera aproximación, se muestran en la Tabla 12. En estos se observa un cambio en la tendencia de hidrólisis para la concentración de NaOH comprendida entre 4.25 y 5.75, el tiempo de pretratamiento entre 83 y 97.8 min y el tiempo de hidrólisis entre 177.2 y

215.34 h. Para verificar si este cambio obedecía a un efecto de curvatura del sistema, se realizó un experimento 2^3 factorial con punto estrella, circundante a la condición en que se registró el cambio de tendencia (5.75, 97.8, 215.34). Los resultados obtenidos (Tabla 13), se analizaron por análisis de variancia. El análisis mostró que el tiempo de hidrólisis dejó de influir significativamente en la respuesta. Por ésta razón, se continuó la optimización con las variables NaOH y tp, a tiempo de hidrólisis constante (240 h). Con el procedimiento descrito en el apartado anterior, se realizó una segunda aproximación, cuyos resultados se muestran en la Tabla 14. El análisis de estos mostró un cambio en la tendencia para una concentración de 7.25% de NaOH y un tiempo de pretratamiento de 131.8 h. Considerando que los valores de la respuesta en éste experimento son muy parecidos a los obtenidos en la etapa anterior, se realizó un experimento más, utilizando el método del diseño central compuesto alrededor del nuevo punto de inflexión. Los resultados obtenidos (Figuras 10 y 11) se analizaron con el software estadístico Design expert 6.0.

5.8. Fermentabilidad de los azúcares obtenidos

Con el propósito de identificar la facilidad de aprovechamiento de los azúcares producidos, se realizaron pruebas de fermentación, utilizando para ello una cepa autóctona de *Saccharomices cerevisiae*, aislada del proceso de producción del mezcal producido en Durango y conservada en Agar Glucosa Sabouraud a pH 5,5. El inóculo se preparó inoculando 100 ml de Caldo Glucosa Sabouraud, con incubación a 28 °C por 24 horas. Transcurrido ese tiempo, se determinó la cuenta total de levaduras por conteo en Cámara de Neubauer, se obtuvieron los hidrólizados enzimáticos, en las condiciones

definidas por el proceso de optimización. Antes de su hidrólisis, los matraces se esterilizaron a 121°C durante 15 min. Transcurrida la hidrólisis, se adicionó un complemento salino (0.02% (m/v) de sulfato de amonio y 0.01% (m/v) de bisulfato de sodio, esterilizado en filtros de celulosa de 0.45 µm de diámetro de poro. Los matraces con el hidrólizado se inocularon con 10⁶ células/mL y se incubaron a 28°C durante 60 h. Durante éste tiempo se tomaron muestras a las 0, 4, 8, 12, 24, 36 y 60 h de fermentación, se determinó la concentración de levaduras por conteo directo de células en la cámara de Neubauer. El contenido de glucosa y la concentración de etanol se determinaron por HPLC, utilizando para ello una columna de intercambio iónico marca PHENOMEX Rezex ROA Organic acid H⁺(8%) de dimensiones 300X7.8 mm, con una precolumna marca PHENOMEX ROA organic acid (8%) de dimensiones 50X7.8 mm, en un detector de índice de refracción modelo 2414 marca Waters, utilizando como fase móvil H₂SO₄ 0.005 N, a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min. La temperatura de la columna fue de 65°C y la del detector de 35°C. Se utilizó un volumen de inyección de 5 µL.

6. RESULTADOS

6.1. Composición química del aserrín

En la Figura 9 se muestran los resultados obtenidos para la composición química del aserrín de pino. Este contiene $26.58 \pm 0.41\%$ de lignina, $20.41 \pm 0.26\%$ de extraíbles, $0.68 \pm 0.02\%$ de cenizas y $52.33 \pm 0.74\%$ de carbohidratos totales (celulosa y hemicelulosa).

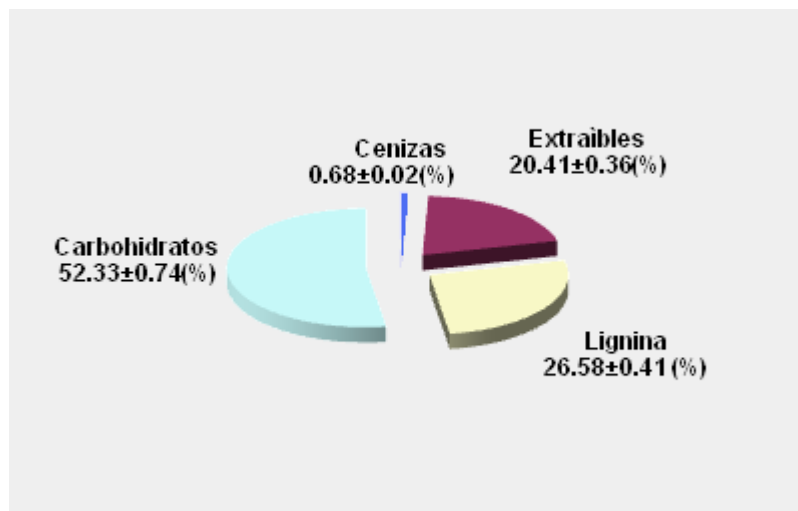


Figura 9. Composición química del aserrín de pino en base seca. Se reportan los promedios de cuatro repeticiones, (Ehrman, 1994^a y b y Templeton y Ehrman, 1995). El contenido de carbohidratos se calculó con la Ecuación 3. Ehrman Tina. 1994^a. Chemical Analysis and Testing Task LAP-005. Standard Method for Ash in Biomass. National Renewable Energy Laboratory, 6 pp; Ehrman Tina. 1994b. Chemical Analysis and Testing Task LAP-010. Standard Method for the Determination of Extractives in Biomass. National Renewable Energy Laboratory, 7 pp y Templeton D and Tina E. 1995. LAP-003. Determination of Acid-Insoluble Lignin in Biomass. National Renewable Energy Laboratory, 13 pp).

6.2. Elección del método de pretratamiento

6.2.1. Pretratamiento alcalino

La Tabla 5 muestra los resultados de la hidrólisis enzimática del aserrín de pino pre tratado con NaOH, realizada con 25 UPF/g de holocelulosa, de un preparado enzimático comercial (Celluclast 1.5L NOVOZYME) a pH de 4.5 y 45 °C, por 72 h. El análisis de varianza de los resultados ($p < 0.05$) mostró que únicamente el tiempo y la temperatura afectan de manera significativa a la hidrólisis enzimática. La comparación de medias por el método de la diferencia mínima significativa (DMS, α 0.05), permitió identificar al pretratamiento que produjo el rendimiento más alto azúcares reductores ($Ar = 29.72 \pm 0.57\%$). Este pretratamiento está constituido por las condiciones más drásticas que fueron probadas ($t_p = 90$ min., NaOH = 3% m/v, $T_p = 120$ °C).

Tabla 5. Hidrólisis enzimática del aserrín de pino pre tratado con NaOH.

Tp (min)	NaOH (% m/v)	Tp (°C)	Azúcares reductores (% m/m)	
			Media	Desvest ¹
30	1	60	8.28	0.56
30	1	120	12.99	1.58
30	3	60	8.80	0.77
30	3	120	13.10	1.11
90	1	60	14.00	7.70
90	1	120	21.28	2.08
90	3	60	21.30	1.70
90	3	120	29.72	0.57

¹Desvests se usa para abreviar el término desviación estándar. La hidrólisis se realizó por duplicado, con 25 UPF/g de holocelulosa de un concentrado enzimático comercial (Celluclast 1.5 L, producido por NOVOZYME), a pH 4.5, durante 72 h a 45 °C. La media y desviación estándar se calcularon mediante el software Excel, de Microsoft Office.

6.2.2. Explosión con vapor

Los resultados de la hidrólisis enzimática del aserrín de pino pre tratado por explosión con vapor, se muestran en la Tabla 6. El análisis de varianza de estos ($p < 0.05$) mostró que el tiempo de pretratamiento no afecta significativamente a la eficiencia de sacarificación, por ello, para el siguiente análisis se tomó el valor promedio de la concentración de azúcares reductores ($9.85 \pm 1.87\%$ m/m), de las tres condiciones probadas. Las condiciones menos drásticas de pretratamiento 30 min a 120 °C.

Tabla 6. Hidrólisis enzimática del aserrín de pino pre tratado por explosión con vapor.

Tp min	Azúcares reductores (% m/m)	
	Media	Desvest
30	11.53	2.52
60	8.20	2.39
90	9.81	2.61

La hidrólisis se realizó por duplicado, a pH 4.5, durante 72 h a 45 °C, con 25 UPF/g de holocelulosa de un concentrado enzimático comercial (Celluclast 1.5 L, producido por NOVOZYME), La media y desviación estándar se calcularon con el software Excel, de Mrosoft Office.

6.2.3. Pretratamiento ácido

En Tabla 7 se reportan los rendimientos de azúcar obtenidos para la hidrólisis enzimática del aserrín de pino pre tratado con H₂SO₄. El análisis de varianza ($p < 0.05$) mostró que el tiempo de pretratamiento es la variable que influye significativamente en el rendimiento de azúcares reductores. La comparación de medias (DMS, α 0.05)

permitió elegir las condiciones en que se produjeron los mejores resultados de hidrólisis ($9.59 \pm 0.39\%$), por éste método. Estas fueron: 1% de H_2SO_4 , a 120 °C, durante 120 min.

6.2.4. Comparación de métodos

Los rendimientos de hidrólisis máximos (Tabla 8), se compararon entre sí por análisis de varianza ($p < 0.05$). El método mostró diferencias significativas en los rendimientos de hidrólisis para los métodos de pretratamiento probados. La comparación de medias (DMS, $\alpha 0.05$), indicó que los métodos de pretratamiento con ácido y por explosión con vapor, producen rendimientos de hidrólisis estadísticamente similares, pero, a su vez, estos son significativamente diferentes a los obtenidos para el pretratamiento con NaOH. Éste último fue el que produjo los rendimientos de hidrólisis más altos. Por ello, fue seleccionado para continuar con los experimentos de optimización.

Tabla 7. Hidrólisis enzimática del aserrín de pino pre tratado con H_2SO_4

H_2SO_4 (% m/v)	T_p (min)	Azúcares reductores (% m/m)	
		Media	Desvest
1	40	7.92	0.93
1	120	9.18	1.20
2	40	7.31	1.08
2	120	8.82	1.15

El pretratamiento se efectuó a 120 °C. La hidrólisis se realizó por duplicado, a pH 4.5, durante 72 h a 45 °C, con 25 UPF/g de holocelulosa de un concentrado enzimático comercial (Celluclast 1.5 L, producido por NOVOZYME), La media y desviación estándar se calcularon con el software Excel, de Microsoft Office.

Tabla 8. Rendimientos de hidrólisis obtenidos con los pre tratamiento probados.

Pretratamiento	Azúcares reductores (% m/m)
Ácido	9.18±1.2
Explosión con vapor	9.85±1.87
Alcalino	29.72±0.57

Se muestran los rendimientos máximos de hidrólisis enzimática, obtenidos para e aserrín de pino pre tratado por los métodos ácido, alcalino y de explosión con vapor.

6.3. Efecto de las variables de hidrólisis sobre el rendimiento de sacarificación

En la Tabla 9 se muestran los resultados del efecto del pH (4.5 y 6.5), la concentración de enzima (25 y 50 UPF/g de holocelulosa) y el tiempo de hidrólisis (72 y 168 h) sobre el rendimiento de sacarificación del aserrín de pino pre tratado con 3% m/v de NaOH, durante 90 min a 120 °C. El análisis de variancia de los resultados ($p < 0.05$) mostró que el tiempo y el pH influyen significativamente en los rendimientos de hidrólisis, en tanto que la concentración de enzima no afaecta significativamente a los mismos.

6.4. Identificación de las variables de optimización

Con el propósito de determinar la influencia de las posibles interacciones entre las condiciones de pretratamiento con las condiciones de hidrólisis, sobre la eficiencia de sacarificación, se realizó un experimento 2^6 factorial, mediante el cual se probaron las condiciones de pretratamiento: NaOH (1 y 3%), Tp (60 y 120 °C) y tp (30 y 90 min.), combinadas con las siguientes condiciones de hidrólisis: pH (4.5 y 6.5), tiempo (72 y

168 h) y concentración del complejo enzimático (25 y 50 UPF/g de holocelulosa). Los resultados se muestran en la Tabla 10. El análisis de varianza ($p < 0.05$) indicó, que la concentración de enzima no influye en la producción de azúcares reductores por hidrólisis enzimática (corroborándose el resultado obtenido en anterior experimento), pero el pH y el tiempo de hidrólisis, al igual que las variables de pretratamiento (incluyendo la concentración de NaOH), afectan significativamente al rendimiento de sacarificación. También se encontró que se presentaron efectos de interacción entre las variables de pretratamiento e hidrólisis (Tabla 11).

Tabla 9. Efecto de las condiciones de hidrólisis sobre el rendimiento de sacarificación del aserrín de pino pre tratado con NaOH en las condiciones seleccionadas.

E (UPF/g)	Th (h)	pH	Azúcares reductores (% m/m)	
			Media	Desvest.
25	72	4.5	29.72	0.57
25	72	6.5	19.12	1.78
25	168	4.5	58.86	11.31
25	168	6.5	44.92	2.47
50	72	4.5	27.73	1.13
50	72	6.5	19.9	3.19
50	168	4.5	66.87	0.9
50	168	6.5	44.37	0.65

Se pre trató aserrín de pino con 3% de NaOH, durante 90 min a 120 °C y se hidrolizó con el complejo enzimático celluclast 1.5 L de NOVOZYME. Los experimentos se realizaron por duplicado y la media y la desviación estándar se calcularon en Excel.

La presencia de interacciones entre las variables de dos procesos diferentes, indica que la optimización deberá contemplar la participación combinada de estas. Los resultados se ajustaron con el modelo estadístico mostrado en la Ecuación 5. El ajuste se

realizó con el software estadístico: Design Expert 6.0. El análisis de efectos principales mostró que el tiempo de pretratamiento contribuye al ajuste del modelo con 31.65%, el pH de hidrólisis con 20.68%, la temperatura de pretratamiento con 14.20%, el tiempo de hidrólisis con 9.99%, la concentración de NaOH con 2.89%, el error puro con 14.93% y el efecto combinado de las interacciones con 5.66%. De lo anterior se concluye, que tanto las variables de pretratamiento, como las de hidrólisis deberán considerarse en los experimentos de optimización.

Tabla 10. Efecto de las variables de pretratamiento e hidrólisis sobre la sacarificación enzimática del aserrín de pino pre tratado con NaOH

tp (min)	NaOH (% m/v)	Tp (°C)	E (UPF/g)	Th (h)	pH	Azúcares reductores (% m/m)	
						Media	Desvest
30	1	60	25	72	4.5	8.28	0.56
30	1	60	25	72	6.5	5.61	0.64
30	1	60	25	168	4.5	16.96	1.98
30	1	60	25	168	6.5	10.12	0.86
30	1	60	50	72	4.5	7.09	0.47
30	1	60	50	72	6.5	5.42	0.72
30	1	60	50	168	4.5	12.79	1.24
30	1	60	50	168	6.5	8.45	1.36
30	1	120	25	72	4.5	12.99	1.58
30	1	120	25	72	6.5	8.27	0.78
30	1	120	25	168	4.5	18.49	0.71
30	1	120	25	168	6.5	12.53	0.50
30	1	120	50	72	4.5	13.25	0.84
30	1	120	50	72	6.5	7.65	0.49
30	1	120	50	168	4.5	17.44	0.92
30	1	120	50	168	6.5	12.22	1.58
30	3	60	25	72	4.5	8.80	0.77
30	3	60	25	72	6.5	6.17	0.58
30	3	60	25	168	4.5	13.52	1.57
30	3	60	25	168	6.5	9.20	0.81
30	3	60	50	72	4.5	10.95	1.24
30	3	60	50	72	6.5	7.18	1.78
30	3	60	50	168	4.5	14.61	2.92
30	3	60	50	168	6.5	6.31	2.30
30	3	120	25	72	4.5	13.10	1.11
30	3	120	25	72	6.5	9.53	0.29

Tabla 10. Continuación

tp (min)	NaOH (% m/v)	Tp (°C)	E (UPF/g)	Th (h)	pH	Azúcares reductores (% m/m)	
						Media	Desvest
30	3	120	25	168	4.5	27.65	8.16
30	3	120	25	168	6.5	21.11	6.05
30	3	120	50	72	4.5	12.82	1.49
30	3	120	50	72	6.5	9.03	1.68
30	3	120	50	168	4.5	26.61	6.16
30	3	120	50	168	6.5	16.88	5.03
90	1	60	25	72	4.5	14.00	7.70
90	1	60	25	72	6.5	9.55	4.25
90	1	60	25	168	4.5	26.10	13.51
90	1	60	25	168	6.5	20.62	11.93
90	1	60	50	72	4.5	14.69	6.38
90	1	60	50	72	6.5	9.16	4.19
90	1	60	50	168	4.5	26.04	15.43
90	1	60	50	168	6.5	20.87	12.34
90	1	120	25	72	4.5	21.28	2.08
90	1	120	25	72	6.5	13.24	1.36
90	1	120	25	168	4.5	47.91	13.50
90	1	120	25	168	6.5	36.36	1.84
90	1	120	50	72	4.5	22.44	1.17
90	1	120	50	72	6.5	13.51	1.32
90	1	120	50	168	4.5	47.25	6.19
90	1	120	50	168	6.5	31.90	5.06
90	3	60	25	72	4.5	21.30	1.70
90	3	60	25	72	6.5	12.47	2.29
90	3	60	25	168	4.5	42.97	3.61
90	3	60	25	168	6.5	22.08	13.14
90	3	60	50	72	4.5	17.99	6.41
90	3	60	50	72	6.5	14.04	3.42
90	3	60	50	168	4.5	27.58	15.77
90	3	60	50	168	6.5	22.76	13.62
90	3	120	25	72	4.5	29.72	0.57
90	3	120	25	72	6.5	19.12	1.78
90	3	120	25	168	4.5	58.86	11.31
90	3	120	25	168	6.5	44.92	2.47
90	3	120	50	72	4.5	27.73	1.13
90	3	120	50	72	6.5	19.90	3.19
90	3	120	50	168	4.5	66.87	0.90
90	3	120	50	168	6.5	44.37	0.65

Se probó el efecto de las variables de pretratamiento (NaOH, tp y Tp), combinadas con las variables de hidrólisis (E, pH t_H), mediante un diseño 2⁶ factorial. Los experimentos se realizaron por duplicado. El promedio y la desviación estándar se calcularon con Excel.

Tabla 11. Efectos de interacción entre las variables de pretratamiento (NaOH, tp y TP), con las variables de la hidrólisis (E, th y pH).

Factor	Coefficiente Estimado	GL	Error estándar	LIC ¹ 95%	LSC ² 95%
Modelo	43825.8	44	996.0	30.5	< 0.0001
tp	14197.3	1	14197.3	434.9	< 0.0001
NaOH	1475.6	1	1475.6	45.2	< 0.0001
T	6056.1	1	6056.1	185.5	< 0.0001
th-pH	10306.5	1	10306.5	315.7	< 0.0001
pH	3526.1	1	3526.1	108.0	< 0.0001
tp-NaOH	418.6	1	418.7	12.8	0.0004
tp-Tp	1140.0	1	1140.0	34.9	< 0.0001
tp-th	2719.1	1	2719.1	83.3	< 0.0001
tp-pH	382.1	1	382.1	11.7	0.0007
NaOH-Tp	300.3	1	300.3	9.1	0.0027
NaOH-th	136.9	1	136.9	4.2	0.0418
Tp-th	1397.5	1	1397.5	42.8	< 0.0001
Tp-pH	157.8	1	157.8	4.8	0.0290
th-pH	258.7	1	258.7	7.9	0.0053
tp-Tp-th	418.5	1	418.5	12.8	0.0004
NaOH-Tp-th	246.8	1	246.8	7.7	0.0065

Resultados significativos del análisis de variancia, que muestran el efecto de la combinación de las variables de pretratamiento e hidrólisis, sobre los rendimientos de sacarificación enzimática (95% de significancia). ¹Limite inferior de control, ²límite superior de control.

$$\begin{aligned}
 \text{Log(Ar)} = & 1.19944018 + 0.1562084 * tp + 0.04726824 * NaOH + 0.11123108 * Tp - 0.01202039 * E \\
 & + 0.12661408 * t_H - 0.08800825 * pH + 0.01812108 * tp * NaOH + 0.01461502 * tp * Tp \\
 & - 0.0036261 * tp * E + 0.02352139 * tp * th + 0.00451532 * tp * pH + 0.01042499 * NaOH * Tp \\
 & + 0.00066028 * NaOH * E - 0.00711444 * NaOH * th - 0.00281944 * NaOH * pH \\
 & + 0.00597853 * Tp * E + 0.02163574 * Tp * th + 0.00328902 * Tp * pH - 0.01181499 * E * th \\
 & - 0.00050848 * E * pH - 0.00021888 * th * pH - 0.01009203 * tp * NaOH * Tp \\
 & - 0.00674107 * tp * NaOH * E - 0.00567261 * tp * NaOH * th - 0.0123105 * tp * NaOH * pH \\
 & + 0.00349758 * tp * Tp * E + 0.00763214 * tp * Tp * th - 0.00342116 * tp * Tp * pH \\
 & + 0.00424281 * tp * E * th + 0.00877007 * tp * E * pH + 0.00717341 * tp * th * pH \\
 & - 1.3006E-5 * NaOH * Tp * E + 0.02209288 * NaOH * Tp * th + 0.00984654 * NaOH * Tp * pH \\
 & - 0.00340025 * NaOH * E * th + 0.00155822 * NaOH * E * pH - 0.00896372 * NaOH * th * pH \\
 & + 0.00856259 * Tp * E * t_H - 0.00692964 * Tp * E * pH - 0.00249574 * E * th * pH \\
 & + 0.0115271 * tp * NaOH * Tp * E - 0.01412021 * tp * NaOH * Tp * th \\
 & - 0.00093684 * tp * NaOH * Tp * pH + 0.01465689 * tp * NaOH * E * pH
 \end{aligned}
 \tag{5}$$

6.5. Optimización del proceso de sacarificación

Para la optimización del proceso de hidrólisis se realizó un ajuste lineal de los resultados del experimento anterior (Ecuación 6).

$$A_R = 9.69 + 4.76tp + 0.80NaOH + 1.88Tp + 3.02th - 1.66pH \quad (6)$$

Como se observa, la respuesta se mueve 0.80 unidades en la dirección de la concentración de NaOH y 3.02 unidades en la dirección del tiempo de hidrólisis (th), por cada 4.76 unidades en la dirección del tiempo de pretratamiento (tp). Con estas relaciones se definió la región experimental para una primera aproximación. Los resultados se muestran en la Tabla 12. Una inspección de los mismos muestra un cambio en la tendencia de hidrólisis para la concentración de NaOH comprendida entre 4.25 y 5.75, por lo tanto se realizó un experimento 2^3 factorial con punto estrella, alrededor de este punto, para verificar si este cambio obedecía a un efecto de curvatura. Los resultados (Tabla 13) se analizaron por procedimiento de ANDEVA, encontrándose que no existían efectos de curvatura y que el tiempo de hidrólisis dejó de afectar a la respuesta. Se realizó un segundo experimento de aproximación 2^3 factorial con punto estrella, a tiempo de hidrólisis constante (240 h), encontrándose (Tabla 14) un nuevo cambio de tendencia para una concentración de 7.25% de NaOH y un tiempo de pretratamiento de 131.8h. La comparación de los valores obtenidos para éste experimento muestra que son muy parecidos a los obtenidos en la etapa anterior, por lo que se realizó un experimento de segundo grado alrededor del nuevo punto de inflexión. Los resultados obtenidos (Figuras 10 y 11) muestran un valor máximo para la respuesta, el cual puede ser considerado como el óptimo para este par de variables.

Tabla 12. Región experimental en la dirección de la trayectoria de optimización para las variables NaOH, tp y th. Primera aproximación.

NaOH (% m/v)	tp (min)	th (h)	Azúcares reductores (% m/m)			
			1	2	Media	Desvest
2	60	120	0.6778	0.6856	0.6817	0.0055
2.75	68	139.07	0.7245	0.7232	0.7239	0.0009
3.5	75	158.13	0.7193	0.7115	0.7154	0.0055
4.25	83	177.2	0.8181	0.8207	0.8194	0.0018
5	90.3	196.27	0.9155	0.9155	0.9155	0.0000
5.75	97.8	215.34	0.7375	0.7401	0.7388	0.0018

Se eligieron las variables tp, NaOH y th para optimizarlas por el método de superficie de respuesta. Se seleccionó arbitrariamente un punto dentro del rango experimental probado y a partir de este se calcularon los valores a experimentar, utilizando para ello las relaciones entre sus pendientes, determinadas por el modelo lineal desarrollado (Ecuación 6).

Tabla 13. Diseño 2^3 factorial con punto estrella alrededor del cambio de tendencia, realizado con el propósito de verificar si éste obedece a un cambio en la curvatura del sistema.

NaOH (% m/v)	tp (min)	th (h)	Azúcares reductores (% m/m)			
			1	2	Media	Desvest
5.75	97.8	215.34	24.31	24.35	24.33	0.02
4.75	87.8	195.34	21.24	21.17	21.20	0.05
4.75	87.8	235.34	22.52	22.52	22.52	0.00
4.75	107.8	195.34	24.51	24.62	24.57	0.07
4.75	107.8	235.34	24.31	24.41	24.36	0.07
6.75	87.8	195.34	26.24	26.31	26.27	0.05
6.75	87.8	235.34	25.93	25.93	25.93	0.00
6.75	107.8	195.34	27.08	27.08	27.08	0.00
6.75	107.8	235.34	27.66	27.72	27.69	0.05

Este experimento corresponde a un experimental 2^3 factorial con punto estrella, circundante a la condición en que se registró el cambio de tendencia (5.75, 97.8, 215.34), en el experimento anterior. El análisis de variancia mostró que, para las nuevas condiciones analizadas, el tiempo de hidrólisis dejó de tener influencia significativa en la respuesta, acotando la optimización para la concentración de NaOH y el tiempo de pretratamiento, a tiempo de hidrólisis constante (240 h).

Tabla 14. Región experimental en la dirección de la trayectoria de optimización para las variables NaOH, tp y th. Segunda aproximación.

NaOH (%)	Tp (min)	Th (h)	Sacarificación (% m/m)			
			1	2	Media	Desvest
5.75	97.8	240	25.47	25.47	25.47	0.00
6.25	109.1	240	25.70	25.66	25.68	0.03
6.50	114.8	240	28.26	28.17	28.22	0.07
6.75	120.5	240	26.05	26.19	26.12	0.10
7.00	126.1	240	27.68	27.54	27.61	0.10
7.25	131.8	240	26.82	26.77	26.80	0.03
7.50	137.4	240	27.59	27.69	27.64	0.07

A partir del punto de inflexión anterior se calcularon los nuevos valores de las variables por optimizar. En este experimento se mantuvo constante el tiempo de hidrólisis (240 h), debido a que el experimento anterior demostró que ya no influía significativamente en la respuesta. Los resultados mostrados en la tabla indican la aparición de una nueva inflexión alrededor de la concentración de 7.25% de NaOH, para un tiempo de pretratamiento de 131.8h.

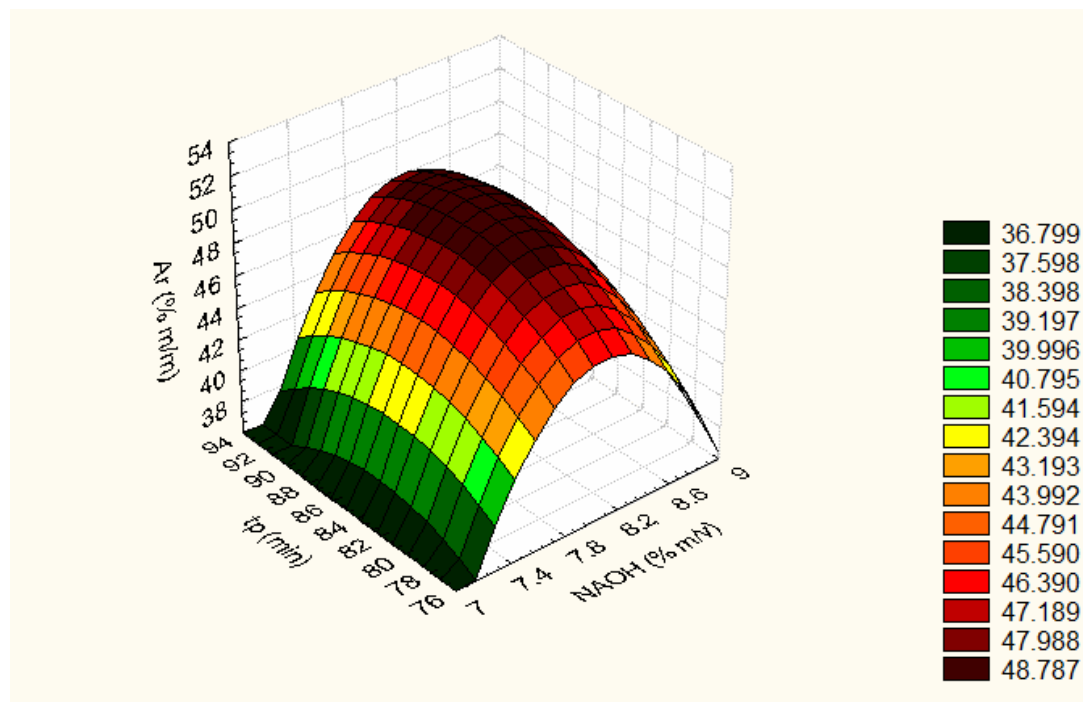


Figura 10. Gráfica de superficie de respuesta que muestra el comportamiento de los rendimientos de hidrólisis alrededor del segundo cambio de tendencia. El máximo observado permitió el cálculo de los valores de NaOH y tp que optimizan la producción de azúcares por hidrólisis del aserrín de pino.

El modelo ajustado para superficie de respuesta (Ecuación 7), se resolvió por el método de máximos y mínimos, encontrándose que los valores que optimizan la respuesta corresponden a una concentración de 7.24% de NaOH y un tiempo de pretratamiento de 90.06 min.

$$Ar = -791.8 + 162.98 * NaOH + 4.02 * tp - 11.07 * NaOH^2 + 0.21 * tp * NaOH - 0.03 * tp^2 \quad (7)$$

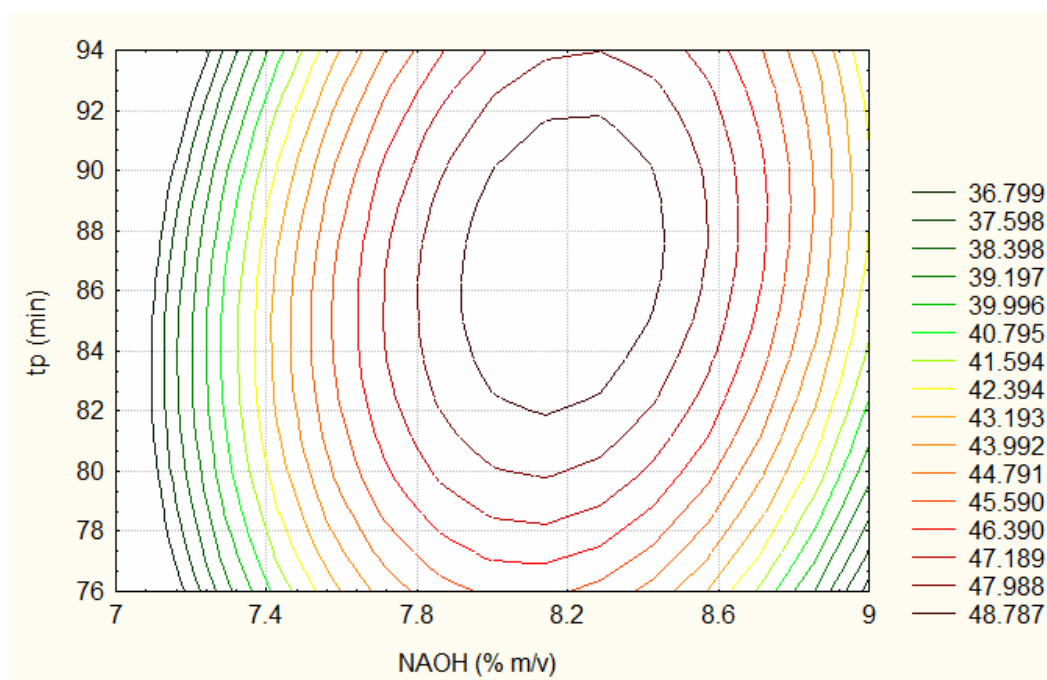


Figura 11. Curvas de nivel que muestran la combinación óptima de las variables de pretratamiento que maximizan la producción de azúcares reductores por hidrólisis enzimática del aserrín de pino.

6.6. Efecto del contenido de lignina sobre el rendimiento de sacarificación

En la Figura 12 se muestran los porcentajes de azúcar obtenidos en relación con el contenido de lignina en los materiales pretratados sometidos a hidrólisis. Como puede

verse, los rendimientos de azúcar se agrupan en dos bloques, uno para los contenidos de lignina comprendidos entre 26 y 27.3% y otro para los comprendidos entre 28 y 29.5%. Los rendimientos de azúcar más altos se obtuvieron para los contenidos de lignina de 28.5% y 28.82%, sin embargo, los contenidos de lignina de las muestras sometidas al proceso de optimización (Figura 13), mostraron un mínimo para las condiciones de pretratamiento de 7.87% de NaOH durante 84.38 min. Estos valores son muy parecidos a los obtenidos para la producción óptima de azúcares reductores (8.24% de NaOH durante 86.6 min).

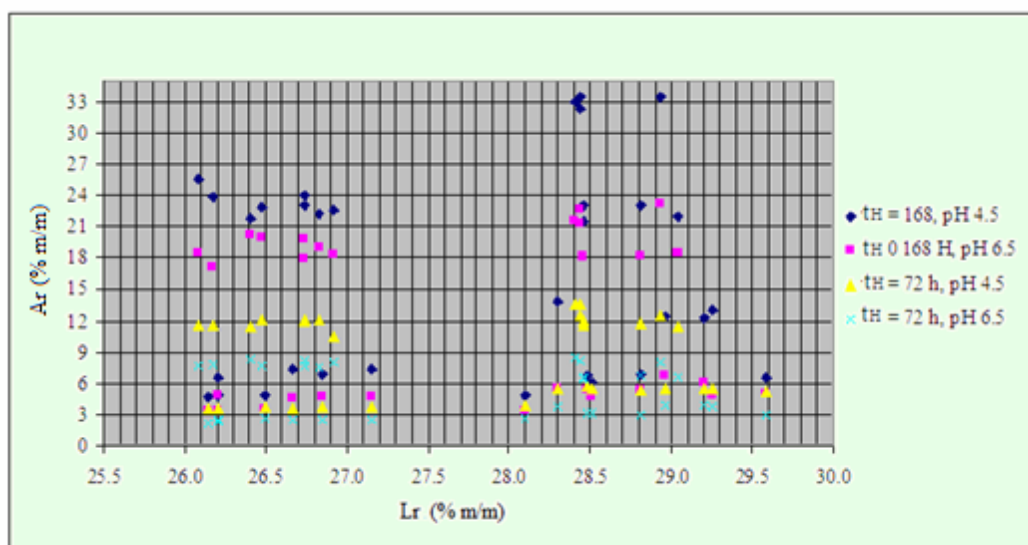


Figura 12. Influencia del contenido de lignina residual en el aserrín pre tratado, sobre el rendimiento de hidrólisis enzimática de su contenido de celulosa. Los valores graficados se obtuvieron con las siguientes condiciones de pretratamiento e hidrólisis: [NaOH] (1-3%), tp (30-90 min), Tp (60-120 °C), pH (4.5-6.5), th (72-168 h), T_H (45 °C) y E (25 UPF/g de holocelulosa).

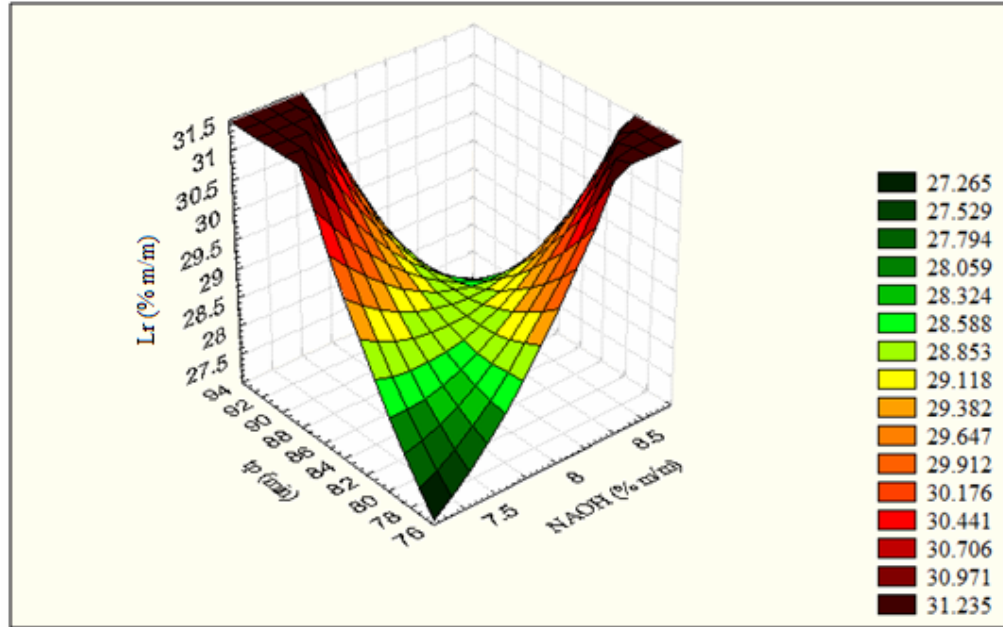


Figura 13 Contenido de lignina en el aserrín pre-tratado, en las condiciones establecidas por el diseño central compuesto. La gráfica muestra la existencia de un mínimo, obtenido en condiciones similares a las encontradas para el máximo de sacarificación.

6.7. Fermentabilidad de los azúcares producidos

Se hidrolizados enzimáticos obtenidos en las condiciones óptimas encontradas, se utilizaron como fuente de carbono para el crecimiento de una cepa autóctona de *S. cerevisiae*, para ello se mezclaron con factores de crecimiento, en condiciones estériles y se inocularon con 10^6 cel/mL, se incubaron a 28 °C por 60 h, durante las cuales se determinó su comportamiento cinético (Figura 14). También se determinó el rendimiento de alcohol producido Y_p/s (0.087), el azúcar consumido durante la fermentación (68%), la proporción de azúcares utilizados para el crecimiento microbiano (57%), la fracción utilizada para la producción de etanol (11%) y la proporción de azúcares residuales (32%).

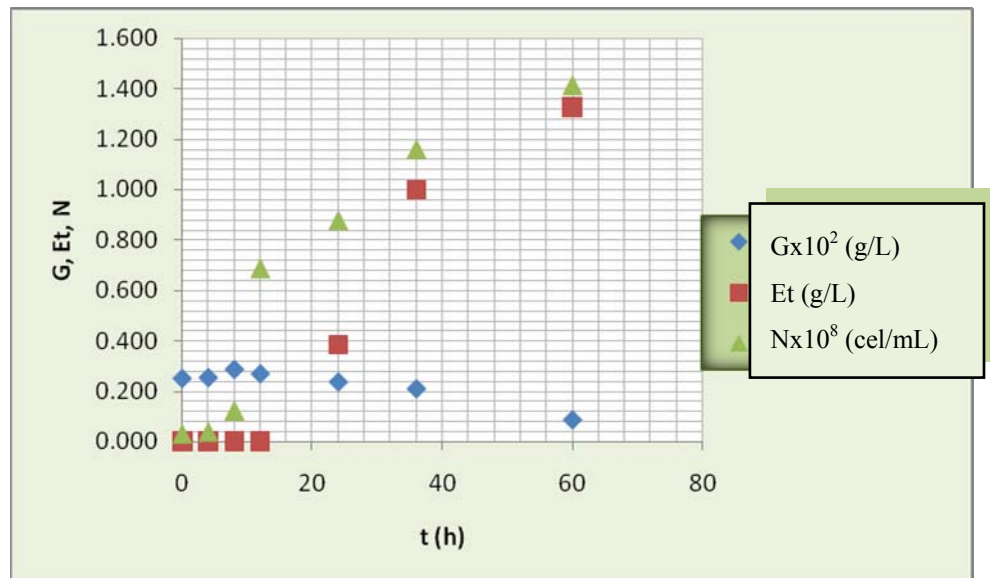


Figura 14. Fementación de los hidrólizados obtenidos con las condiciones óptimas de pretratamiento e hidrólisis, utilizando una cepa autoctona de *Saccharomyces cerevisiae*. Las condicines de fermentación fueron 28 °C un, con pH de 5.0 duranter 60 horas.

7. Discusión de resultados

7.1. Composición química del aserrín de pino

El aserrín de pino utilizado como material de estudio tiene un contenido de holocelulosa 25% menor que el reportado para *Picea*, una madera dura, pero es comparable con el reportado para la cáscara de nuez, la paja de arroz y una hierba conocida como *Switch grass* (Wiselogel *et al.* 1996). En cuanto a la lignina, contiene 9% menos que el reportado para pino, 7.5% menos que la reportada para madera dura (*picea*), 24% menos que la cáscara de nuez, 48% más que la paja de arroz y 51% más que la hierba *Swiitch grass* (Wiselogel *et al.* 1996). Considerando que la composición de la biomasa lignocelulósica determina la eficiencia de su conversión en etanol (Hamelink *et al.*, 2005, Hames *et al.*, 2003), se puede decir que, el aserrín de pino puede ser una buena materia prima para la producción de etanol.

7.2. Elección del método de pretratamiento

Con el propósito de elegir el mejor método, se probaron los pretratamientos con ácido sulfúrico, explosión con vapor y con NaOH, en distintas condiciones. Se identificaron las variables que definen su comportamiento de hidrólisis y se compararon entre sí los rendimientos de hidrólisis máximos obtenidos para cada uno de los

procedimientos probados, por análisis de variancia. Los resultados obtenidos muestran que el rendimiento máximo de los procedimientos de pretratamiento con ácido sulfúrico ($9.59 \pm 0.39\%$) y por explosión con vapor ($9.85 \pm 1.87\%$), es estadísticamente igual ($p < 0.05$). Estos rendimientos son tres veces menores que el máximo obtenido para la hidrólisis del aserrín pre tratado con NaOH ($29.72 \pm 0.57\%$ m/m), son tres veces menores a los reportados por Wingren y colaboradores (2008), para maderas suaves pretratadas por explosión con vapor ($160 < T < 190$ °C) y también son tres veces menores a los reportados por Saha y colaboradores (2005), para la hidrólisis de cascarilla de arroz y son 7.3 veces menores que los reportadas por Ojumu y Ogunkunle (2005), para la hidrólisis enzimática del aserrín proveniente de *Triplochiton scleroxylon*, un árbol tropical originario de África occidental. Los rendimientos de hidrólisis obtenidos con estos procedimientos son bajos, esto puede atribuirse a la temperatura usada (120 °C), la cual es menor a las utilizadas por los otros autores. Además, el pretratamiento por explosión con vapor se efectuó al pH natural del aserrín y algunos autores recomiendan adicionar pequeñas concentraciones de ácidos minerales (Wyman *et al.*, 2005; Kristensen *et al.*, 2008). Considerando que el efecto combinado del gradiente de presión, la temperatura de pretratamiento, el contenido de humedad y la concentración del ácido pueden mejorar los rendimientos de hidrólisis, Ojumu y Ogunkunle (2005) recomiendan el uso combinado de los métodos de pretratamiento con ácidos minerales a baja concentración, y la explosión con vapor. Para el pretratamiento con NaOH, los resultados obtenidos son comparables con los reportados por Wringler y colaboradores (2008) y Ojumu y Ogunkunle (2005), pero son 7 veces mayores que los obtenidos por Soto y colaboradores (1994), para cascos de girasol pre tratados con NaOH, en condiciones similares (3% de NaOH, por 1.5 h a 120 °C). La combinación de las

variables temperatura-tiempo-concentración del catalizador, disminuyen los contenidos de lignina y hemicelulosa en el material, modifican la cristalinidad de la celulosa, favorecen la formación de sitios amorfos, facilitan la acción hidrolítica de las endoglucanasas, se aumenta el número extremos terminales y se facilita la acción hidrolítica de las celobiohidrolasas I y II (Carrard *et al.*, 2000). (Linder y Teery, 1996).

7.3. Influencia de las variables de hidrólisis sobre el rendimiento de sacarificación enzimática del aserrín de pino pre tratado con NaOH

El análisis de variancia de los resultados del estudio del efecto de las variables de hidrólisis (pH, concentración de enzima y tiempo) sobre el rendimiento de sacarificación enzimática del aserrín de pino, pre-tratado en las condiciones previamente establecidas, muestra, que el tiempo y el pH de hidrólisis afectan significativamente a los rendimientos de hidrólisis, pero la concentración de enzima no mostró tener efecto alguno. Estos resultados concuerdan con los reportados por Soto *et al.*, (1994), quienes establecieron que, a partir de 25 UPF/g de, la sacarificación enzimática de la celulosa se hace independiente de la concentración de enzima. Por otra parte, Pillipidis y Hatzis, (1997), encontraron que el rendimiento de hidrólisis aumenta linealmente con la dosis de enzima, hasta 20 UPF/g, pero cuando ésta se aproxima a 40 UPF/g, se alcanza la concentración de saturación del sustrato y el parámetro deja de ser importante. Respecto al pH de hidrólisis, los resultados apuntan en la dirección decreciente (<4.5), sin embargo, el valor mínimo utilizado corresponde al límite inferior de máxima estabilidad de la enzima (Belkacemi *et al.*, 1997; Cohen *et al.*, 2005: Rosgaard y colaboradores, 2006) para el complejo enzimático (4.5-5.5) y respecto al tiempo de hidrólisis, podemos

decir que está relacionado con la complejidad del material y con la estabilidad de los enlaces glucosídicos, la cual está determinada por el enorme número de puentes de hidrógeno (Povh and Rosina. 2005).

7.4. Efecto de la combinación de variables de pretratamiento e hidrólisis, sobre la eficiencia de sacarificación

Para éste experimento, el análisis de varianza muestra que, con excepción de la concentración de enzima, las demás variables influyen significativamente en el rendimiento de hidrólisis. También evidencia la presencia de interacciones entre las variables de pretratamiento e hidrólisis (Tabla15), mostrando que los cambios ocurridos al sustrato, como consecuencia de las condiciones de pretratamiento, determinan la eficiencia de sacarificación. El análisis de efectos principales mostró que el tiempo de pretratamiento, el pH de hidrólisis y la temperatura de pretratamiento contribuyen con un 48.7%, al ajuste del modelo, en tanto que las variables de hidrólisis lo hacen con 30.67%, el error puro con 14.93% y el efecto combinado de las interacciones con 5.66%. Estos resultados muestran que la optimización del proceso de sacarificación, no puede soslayar la participación, tanto de las variables de pretratamiento, como las de hidrólisis, por ésta razón serán consideradas juntas en los experimentos de optimización.

7.5. Optimización del proceso de hidrólisis

Para la optimización se seleccionó al tiempo de pretratamiento, la concentración de NaOH y el tiempo de hidrólisis como las variables a optimizar. Ello obedeció a

consideraciones tanto de tipo técnico, para la temperatura, como funcional, en el caso del pH. Como resultado del proceso de optimización, se recuperó un máximo de 48 % (m/m) de los azúcares contenidos en el aserrín pretratado. Este rendimiento es muy parecido al reportado para cascos de girasol (50%), por Soto y colaboradores, (1994). Sin embargo, las condiciones de pretratamiento encontradas, son muy severas (7.24 % m/v de NaOH, a 120 °C, durante 90 min), y estas pueden afectar la decisión de usar esta importante materia prima para la producción de etanol combustible. Es conveniente mencionar, que debe intentar la optimización de la temperatura de pretratamiento y del pH de hidrólisis, ya que juntas contribuyeron con un 35% al ajuste del modelo.

7.6. Efecto del contenido de lignina sobre la eficiencia de sacarificación

Los contenidos de lignina en las muestras pretratadas con NaOH, durante la optimización del proceso de sacarificación (Figura 6), muestran un comportamiento *suigeneris*, ya que la función de la superficie muestra la presencia de un mínimo para las condiciones que propiciaron el óptimo de hidrólisis. (Figuras 3 y 6). Sin embargo, se percibe la existencia de otros mínimos de menor valor, pero que no producen los efectos deseados en el material sometido a hidrólisis. Los resultados sin embargo, satisfacen la propuesta de Mansfield y colaboradores (1999), quienes al respecto mencionan, que la eficiencia de hidrólisis de la celulosa depende del contenido de lignina residual en el material pretratado. Por otra parte, la disolución de hemicelulosas y ligninas durante el pretratamiento (Åkerholm y Salmén, 2002), permiten la incorporación de una cantidad considerable de agua al interior del material pretratado, provocando la formación de canales de flujo, que facilitan el desplazamiento y la acción hidrolítica de las celulasas

(Åkerholm y Salmén, 2002). En el caso del aserrín, como consecuencia del pretratamiento, su contenido de humedad aumento de 6 a 7 veces, en relación con el aserrín sin tratar ($11.1327 \pm 0.27\%$). Esta captación de agua está relacionada con la perdida de estabilidad de las cadenas de celulosa (Heiner *et al.*, 1998), debida probablemente a cambios de estructurales que favorecen el movimiento procesivo de las celobiohidrolasas I y II, y el desplazamiento aleatorio de las endoglucanasas, entre los sitios erosionados de las fibras de celulosa (Väljäme *et al.*, 1999; Väljäme *et al.*, 2001; Cohen *et al.*, 2005). Estas transformaciones están relacionadas con la concentración del hidróxido de sodio y con el tiempo de pretratamiento (Tuor *et al.*, 1995).

7.7. Fermentabilidad de los azúcares producidos

La prueba de fermentabilidad consistió en hacer crecer una cepa autóctona de *Saccharomyces cerevisiae*, en un medio de cultivo, cuya fuente de carbono estaba constituida por los azúcares obtenidos de la hidrólisis enzimática del aserrín de pino pre tratado con NaOH. En relación con la producción de etanol (Figura 8), se obtuvo un rendimiento de fermentación de 0.087 g de etanol/g de azúcar alimentado, éste rendimiento es bajo y su valor puede atribuirse a que durante la fermentación se presentó un crecimiento constante del cultivo microbiano. Durante la misma el 57% de los azúcares suministrados se consumió, en el crecimiento de la población microbiana y sólo el 11% en la producción de etanol. Además, después de 60 h de fermentación, aun se recuperó un 32% de azúcares residuales en el mosto. Estos resultados se compararon con los obtenidos por Saha y colaboradores (2005) y se encontró que los rendimientos de

azúcar obtenidos por ellos, por hidrólisis ácida de $21 \pm 2.5\%$, para Lantana cámara, produjeron un rendimiento máximo de $7.5 \pm 0.15\%$ de etanol, con respecto al contenido de azúcar alimentado en el sistema. Lo anterior significa que, aunque la fermentabilidad de los azúcares producidos durante la hidrólisis enzimática del aserrín de pino es baja, no ésta tan alejada de la reportada en la literatura.

8. CONCLUSIONES

Los resultados reportados y su análisis permiten concluir que:

1. La composición química del aserrín de pino colectado en Durango-México, se encuentra dentro del rango reportado por la literatura, para este tipo de materiales.
2. Su contenido de carbohidratos totales (holocelulosa) y su abundancia en la región de estudio, lo sitúan como una materia prima potencialmente importante para la producción de etanol combustible.
3. Respecto a los procedimientos de pretratamiento probados, el alcalino es el que produce los rendimientos más altos de azúcares reductores, en el proceso de hidrólisis enzimática, por ello, fue elegido sobre los pretratamientos por explosión con vapor y con ácido sulfúrico.
4. En relación con las variables de hidrólisis se encontró, que la concentración de enzima mayor a 25 UPF/g, dejan de ser importantes en el rendimiento de hidrólisis.
5. La optimización del procedimiento de sacarificación debe realizarse con la inclusión combinada de las variables de pretratamiento e hidrólisis, de no hacerse así, se pueden obtener valores óptimos, para las variables del proceso, alejados del valor verdadero.

6. Se demostró que el rendimiento de sacarificación depende del contenido de lignina residual en el material pre tratado y que el comportamiento de la disminución de ésta, es exactamente inverso al del rendimiento de hidrólisis. Además, puede decirse que tanto la lignina extraída (expresada como la diferencia en peso de la lignina en el material pretratado respecto del material extraído), al igual que los azúcares producidos en la hidrólisis enzimática, dependen de la intensidad del pretratamiento.
7. La intensidad del pretratamiento está determinada por la combinación de las variables de temperatura, tiempo y concentración de NaOH y la cantidad de agua absorbida por el material durante el mismo, contribuye al incremento en la velocidad de hidrólisis.
8. La fermentabilidad de los azúcares es baja (68%). El 84% de los azúcares consumidos se utilizaron para el crecimiento celular y el 16 % restante para la producción de etanol (es decir, sólo el 11% de los azúcares alimentados se usaron en la producción de etanol). Por consecuencia, el rendimiento obtenido fue bajo ($Y_{p/s}=0.087$).
9. Las condiciones de proceso que permiten alcanzar el máximo rendimiento de azúcares fermentables (48% m/m) a partir del aserrín de pino son: Tiempo de pretratamiento (85 minutos), Concentración de NaOH (8%), Temperatura de pretratamiento (120 °C), Tiempo de hidrólisis (240 h), pH de hidrólisis (4.5) y Carga enzimática (25 UPF/g de aserrín pre tratado)

LITERATURA CITADA.

Abatzoglou, N., Chornet E., Belkacemi K., Overend, RP. 1992. Phenomenological kinetics of complex systems: the development of generalized severity parameter and its application to lignocellulosic fractionation. Chem. Eng. Sci., 47:1109-1122.

Åkerholm M. and L. Salmén. 2002. Dynamic FTIR spectroscopy for carbohydrate analysis of wood pulps. J. Pulp. Paper. Sc. 28:245-249.

Åkerholm, M., Salmén, L. 2001. Interactions between wood polymers studied by dynamic FT-IR spectroscopy, Polymer, 42:963-969.

Atalla RH, Hackney JM, Uhlin I and Thompson NS. 1993. Hemicelluloses as structure regulators in the aggregation of native cellulose. Int. J. Biol. Macromol., 15:109-112.

Atev AP, Spassov AD, Obreshkova AD and Boubareva LG. 1983. Byosynthesis of cellulase and hemicellulase enzymes at the cultivation of *Trichoderma S.P.* 414 in plant substrates. Copt. Rend. Acad. Bulg. Scs. 36:941-944.

Balaban M and Güneş U. 1999. The effect of the duration of alkali treatment on the solubility of polyoses. Tr. J. of Agr. Forest. 23:667-671.

Barceló AR. 1997. Lignification in plant cell walls. Int. Rev. Cyt. 176:87-132.

Belkacemi K, Ginette T, Philippe S, and Esteban Ch. 1997. Ethanol production from enzymatic hydrolyzates of cellulosic fines and hemicellulose-rich liquors derived from aqueous/steam fractionation of forages. Ind. Eng. Chem. Res. 36:4572-4580.

Bender R. 1979. Method of treating lignocellulose materials to produce ruminant feed. U.S. Patent, 4136207.

Boudet AM, Kajita S, Grima-Pettenati J, Goffner D. 2003. Lignins and lignocellulosics: a better control of synthesis for new and improved uses. Trends Plant Sci., 8:576-581.

Boudet AM. 1998. A new view of lignification. Trends Plant Sc. 3:67-71.

Brunow G, Kilpeläinen I, Sipilä J, Syrjänen K, Karhunen P, Setälä H, Rummakko P. 1998. Oxidative coupling of phenols and the biosynthesis of lignin. In Lignin Lignan Biosyn. Eds. N.G. Lewis, S. Sarkanen, Am. Chem. Soc., ACS Symp. Series 697, Washington DC, USA, pp. 131-147.

- CAB Internacional. 2002. *Pinus* of silvicultural importance. CABI Publ. UK. pp 528.
- Cara C, Ruiz E, Ballesteros M, Manzanares P, Negro M. y Castro E. 2008. Production of fuel ethanol from steam-explosion pretreated olive tree pruning. *Fuel J.* 87:692-700.
- Carrard G and Markus L. 1999. Widely different off rates of two closely related cellulose-binding domains from *Trichoderma reesei*. *Eur. J. Biochem.* 262:637-643.
- Carrard G, Anu K, Hans S, and Pierre B. 2000. Cellulose-binding domains promote hydrolysis of different sites on crystalline cellulose. *PNAS.* 97:10342–10347.
- Cohen R, Melissa R. Suzuki, and Kenneth EH. 2005. Processive Endoglucanase Active in Crystalline Cellulose Hydrolysis by the Brown Rot Basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. *Appl. and Environ. Microbiol.* 71:2412-2417.
- Demain AL, Newcomb M. Wu JHD, 2005. Cellulase, clostridia, and ethanol. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69:124-154.
- Desai SG, Converse AO. 1997. Substrate reactivity as a function of the extent of reaction in the enzymatic hydrolysis of lignocelluloses. *Biotech. Bioeng.* 56:650-665.
- Desai SG, Converse AO. 1997. Substrate reactivity as a function of the extent of reaction in the enzymatic hydrolysis of lignocelluloses. *Biotech. Bioeng.* 56:650-665.
- Ehrman Tina. 1994a. Chemical analysis and testing task laboratory analytical procedure. LAP-005. Standard method for ash in biomass. NREL. 6 pp.
- Ehrman Tina. 1994b. Chemical analysis and testing task laboratory analytical procedure. LAP-010. Standard method for the determination of extractives in biomass. NREL. 7 pp.
- Esteghlalian RA, Mahina B, Shawn DM, and John NS. 2001. Do enzymatic hydrolyzability and simons'stain reflect the changes in the accessibility of lignocellulosic substrates to cellulase enzymes?. *Biotechnol. Prog.* 17:1049-1054.
- Fardim P, and Nelson D. 2004. retention of cellulose, xylan and lignin in kraft pulping of *Eucalyptus* studied by multivariate data analysis: Influences on physicochemical and mechanical properties of pulp. *J. Braz. Chem. Soc.* 15:514-522.
- Farone AW and John EC. 1996. Method of separating acids and sugars. resulting from strong acid hydrolysis. U.S. Pat. 5580389.
- Farone WA, Irving and Jhon FC. 1998. Method of removing silica or silicates from solids resulting from the strong acid hydrolysis of cellulotics and hemicellulosic materials. U. S. Pat. 5782982.

Ge. Y, NI Y, Yan H, Chen Y and Cai T. 2002. Optimization of the supercritical fluid extraction of natural vitamin e from wheat germ using response surface methodology. *J. Food Sc.* 67:249-263.

Ghose T. K. 1987. Measurement of cellulase activities. *P. Appl. Chem.* 59:257-268.

Goldstein IS. 1989. Organic chemicals from biomass. CRC Press, USA. 310 pp

Gramajo D, Mónica B, Carlos MB and Horacio NS. 2004. Water Tolerance and ethanol concentration in ethanol-gasoline fuels at three temperatures. *En. Fuels.* 18:334-337.

Gregg DJ, Saddler JN. 1996. Factors affecting cellulose hydrolysis and the potential of enzyme recycle to enhance the efficiency of an integrated wood to ethanol process. *Biotech. Bioeng.* 51:375-383.

Hamelinck CN, Hooijdonk GV and Faaij AP. 2005. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle-, and long-term. *Biomass and Bioen.* 28:384-410.

Hames BR, Thomas SR, Sluiter AD, Roth CJ, and Templeton DW. 2003. Rapid biomass analysis. New tools for compositional analysis of corn stover feedstocks and process intermediates ethanol production. *Appl. Biochem. Biotech.* 108:5-16.

Heiner AP, Lauri K, Olle T. 1998. Comparison of the interface between water and four surfaces of native crystalline cellulose by molecular dynamics simulations. *Carb. Res.* 306:205-220.

Hoppe GK, Hansford GS. 1982. Ethanol inhibition of continuous anaerobic yeast growth. *Biotechnol. Lett.* 4:39-44.

Hsu TA. 1996. Pretreatment of biomass. In: Wyman, C.E. (Ed.), *Handbook on Bioethanol Production and Utilization*. In: *Appl. En. Tech. Series*. Taylor & Francis, Washington DC. Chapter 10.

Jervis EJ, Charles AH, and Douglas GK. 1997. Surface Diffusion of Cellulases and their isolated binding domains on cellulose. *J. Biol. Chem.* 272:24016-24023.

Jollez, P, Laborde P, Chornet E. 1997. Steam explosion ethanol and co-products (extracts). In: Stumborg MA, *Ethanol Research and Development Workshop*, Ottawa, Ontario, Canada. pp 103.

Klinton Bill. 1999. Orden ejecutiva 13134. Casa Blanca, USA.

Kosaric N, Wieczorek A, Cosentino GP, Mager R, Prenosil J. 1983. Ethanol fermentation. *Biotechnol.* 3:257-385.

Kristensen BJ, Lisbeth GT, Claus F, Henning J and Thomas E. 2008. Cell-wall structural changes in wheat straw pretreated for bioethanol production. *Biotechnol. Biofuels*. 1:5-14.

Kubo S and John FK. 2005. Hydrogen Bonding in Lignin: A Fourier Transform Infrared model compound study. *Biomacromolec.* 6:2815-2821.

Kumar ACh, Chan ES, Ravinder RM, Lakshmi NL, Venkateswar R and Pogaku R. 2007. Economics and environmental impact of bioethanol production technologies. *App. Biotechnol. Mol. Biol. Rev.* 2:14-32.

Laine C, Tamminen T, Vikkula A, Vuorinen T. 2002. Methylation analysis as a tool for structural analysis of wood polysaccharides. *Holzforschung*, 56:607-614.

Laine Ch. 2005. Structures of hemicelluloses and pectins in wood and pulp. Doctoral Thesis, Helsinki Univ. Technol. 15-20 pp

Lee D, Vance N. Owens, Arvid Band Peter J. 2007. Composition of Herbaceous Biomass Feedstocks. Report Sponsored by Sun Grant Initiative NCC South Dakota St. Univ. Plant Sc. Dep. 1-16 pp.

Lin Y and Shuzo T. 2006. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69:627-642.

Linder M, Teeri TT. 1996. The cellulose-binding domain of the major cellobiohydrolase of *Trichoderma reesei* exhibits true reversibility and a high exchange rate on crystalline rate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93:12251–12255.

Liu J, Yuan W and Tao L. 1999. Copolymerization of lignin with cresol catalyzed by peroxidase in reversed micellar systems. *EJB*. 2:82-87.

Lynd LR, Weimer PJ, van Zyl WH, Pretorius IS. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Mol Biol. Rev.* 66:506–577.

Lynd LR, Wyman CE and Gerngross TU. 1999. Biocommodity Eng. *Biotechnol. Prog.* 15:777-793.

Malcolm BR. 1999. Cellulose structure and biosynthesis. *Pure. Appl. Chem.* 71:767-775.

Mansfield SD, Caitriona M, and Jhon NS. 1999. Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. *Biotechnol. Prog.* 15:804-816.

Marten R, Mark SV, Saad AK, and David FO. 1996. Rheological, mass transfer, and mixing characterization of cellulase-producing *trichoderma reesei* suspensions. *Biotechnol. Prog.* 12:602–611.

Martínez JM, Jordi R, Miguel AM, Daniel M, Juan S, and Xavier F. 1997. Hydrolytic pretreatment of softwood and almond shells. Degree of polymerization and enzymatic digestibility of the cellulose. *Ind. Eng. Chem. Res.* 36:688-696.

McCloy B.W and O'Connor D.V. 1999. Wood-ethanol opportunities and barriers. 55 pp.

McLean WB, Alisdair BB, Darren B, Nooshafarin S, Colin AF, Antony JW, Douglas GK, and Charles AH. 2002. Carbohydrate-binding modules recognize fine substructures of cellulose. *J. Biol. Chem.* 277:50245–50254.

Mejía CT, Fidel ML, Arturo GR y Jaime OL. 2002. Proteínas con afinidad a celulosa: una herramienta en biotecnología. *Av. Perspec.* 21:267-271.

Miller G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.* 31:426–428.

Mirov NT. 1967. *The Genus Pinus*. Ronald Press, New York, 602 pp.

Montgomery DC. 1991. *Diseño y Análisis de Experimentos*. Ed. Limusa W. 686 pp.

Monties B. 1994. Chemical assesment of lignin biodegradation some qualitative and quantitative aspects. *FEMS Microbiol. Rev.* 13:277-284.

Novak, M., Strehaiano P, Moreno M, Goma G. 1981. Alcoholic fermentation on the inhibitory effect of ethanol. *Biotechnol. Bioeng.* 23:201–211.

Ojumu TV and Ogunkunle OA. 2005. Production of glucose from lignocellulosic under extremely low acid and high temperature in batch process, auto-hydrolysis approach. *J. Appl. Sc.* 5: 15-17.

Oshima H, Burns DS and Converse AO. 1990. Adsorption of cellulase from *Trichoderma reesei* on cellulose and lignaceous residue in wood pretreated by dilute sulfuric acid with explosive decompression. *Biotech. Bioeng.* 36:446–452.

Palonen H, Maija T and Markus L. 1999. Dynamic interaction of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolases cel6a and cel7a and cellulose at equilibrium and during hydrolysis. *Appl. Environ. Microbial.* 65:5229–5233.

Pereira RL. 2003. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. *Quim. Nova.* 26:863-871.

Philippidis GP and Christos H. 1997. Biochemical engineering analysis of critical process factors in the biomass-to-ethanol technology. *Biotechnol. Prog.* 13:222-231.

Povh V and Mitja R. 2005. *Scattering and structures. essentials and analogies in quantum physics*. Springer Berlin. 270 pp.

Ralph J and Fachuang L. 1998. The DFRC Method for lignin analysis. A simple modification for identifying natural acetates on lignins. J. Agric. Food Chem. 46:4616–4619.

Ramos RLB, Tovar FJ, Junqueira RM, Lino FB and Sachetto-Martins G. 2001. Sugarcane expressed sequences tags (ESTs) encoding enzymes involved in lignin biosynthesis pathways. Genet. Mol. Biol. 24:235-241.

Ramos, L. P. 2001. Determination of cellulose degree of polymerization using universal calibration and gel chromatography. In: Proceed. Seventh Brazilian Symp. Chem. Other Wood Comp. Fed. Univ. Viscosa, Belo Horizonte, Brasil. pp. 17-24.

Reid DI and Michael GP. 1994. Effect of residual lignin type and amount on bleaching of kraft pulp by *trametes versicolor*. Appl. Environ. Microbiol. 60:1395-1400.

Richardson DM. 1998. Ecology and biogeography of *Pinus*. Cambridge University Press. United Kindom. 527 pp.

Roncero VB. 2001. Obtención de una secuencia “TCF” con la aplicación de ozono y enzimas, para el blanqueo de pastas madereras y de origen agrícola. Optimización de la etapa Z. Análisis de los efectos en la fibra celulósica y sus componentes. Tesis Doc. U. P. Cataluña Esp.

Rosgaard L, Sven P, Joel RCh, Paul H and Anne SM. 2006. Efficiency of new fungal cellulase systems in boosting enzymatic degradation of barley straw lignocellulose. Biotechnol. Prog. 22:493–498.

Saha CB, Loren BI, Michael AC, and Victor YW. 2005. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification, and fermentation of rice hulls to ethanol. Biotechnol. Prog. 21:816-822.

Schell JD, Jenny H, Juan CS, Arun T, Millie N, Nancy D, and James DM. 2003. Cellulase production on pure cellulose using *Trichoderma reesei* strains L27, RL-P37, Rut C-30, and MTC-a-13. 25th Symp. Biotech. fuels chem. REL. Breckenridge, Colorado. May 4-7.

Schultz TP and Burns DA. 1990. Rapid secondary analysis of lignocelluloses: comparison of near infrared (FTIR). Tappi J. 73:209-212.

Sederoff R.R, MacKay JJ, Ralph J and Hatfield RD. 1999. Unexpected variation in lignin. Curr. Opin. Plant. Biol. 2:145–152.

SEMARNAT. 2003. Anuario Estadístico de la Producción Forestal. Subsecretaría de Gestión para la Protección Ambiental, Dirección General de Gestión Forestal y de Suelos, México.

Shimizu, K. 2001. Chemistry of hemicelluloses; in: Wood and Cellulosic Chemistry. Marcel Dekker Inc 2nd edition, New York, USA, pp. 177-214.

Sjöström E. 1993. Wood Chemistry: Fundamentals and Applications. Academic Press.

Soto ML, Dominguez H, Nunez MJ and Lema JM. 1994. Enzymatic saccharification of alkali treated sunflower hulls. *Biores. Tech.* 49:53-59.

Teeri T. 1997. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. *Trends. Biotechnol.* 15: 160-167.

Templeton D and Tina E. 1995. Chemical analysis and testing task laboratory analytical procedure. LAP-003. Determination of Acid-Insoluble Lignin in Biomass. NREL. 13 pp.

Torget WR, Jun SK and Lee YY. 2000. Fundamental aspects of dilute acid hydrolysis/fractionation kinetics of hardwood carbohydrates. 1. Cellulose hydrolysis. *Ind. Eng. Chem. Res.* 39:2817-282.

Tsao GT. 1987. Pre-post treatment In Anaerobic digestion of biomass. Elsevier Publishers. London.

Tuor, U, Winterhalter K and Fiechter A. 1995. Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. *J. Biotechnol.* 41:1-17.

Ucar G and Mualla B. 2003. Hydrolysis of Polysaccharides with 77% Sulfuric acid for quantitative saccharification. *Turk. J. Agric. For.* 27:361-365.

U.S. Department of Energy. 2006. Handbook for Handling, Storing, and Dispensing E85. DOE-NREL. NEVC. 28 pp.

Väljåne P, Göran P and Gunnar J. 2001. Mechanism of substrate inhibition in cellulose synergistic degradation. *Eur. J. Biochem.* 268: 4520-4526.

Väljåne P, Veljo S, Anu N, Göran P and Gunnar J. 1999. Acid hydrolysis of bacterial cellulose reveals different modes of synergistic action between cellobiohydrolase I and endoglucanase I. *Eur. J. Biochem.* 266: 327-334.

Whetten RW, Mackay JJ and Sederoff RR. 1998. Recent advances in understanding lignin biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 49:585-609.

Wingren A, Galbe M, Zacchi G 2003. Techno-Economic evaluation of producing ethanol from softwood: comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. *Biotechnol. Prog.* 19:1109-1117.

Wiselogle AE, Agblevor FA, Johnson DK, Deutch S, Fennell JA and Sanderson MA. 1996. Compositional changes during storage of large round switchgrass bales. *Bioresour. Technol.* 56:103–109.

Wyman C.E. 1999. Biomass ethanol: technical progress, opportunities, and commercial challenges. *Annual Rev. En. Environ.* 24:189–226.

Wyman CE, Dale BE, Elander RT, Holtzapple M, Ladisch MR, Lee YY. 2005. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresour Technol.* 96:1959-66.

Wyman CE. 1994. Ethanol from lignocellulosic biomass: technology, economics, and opportunities. *Bioresour. Technol.* 50:3–16.

Yang R, Zhang C, Feng H and Yang W. 2006. A kinetic study of xylan solubility and degradation during corncob steaming. *Biosys. Eng.* 93:375–382.

RESUMEN BIOGRAFICO

Javier López Miranda

Candidato para el Grado de

DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD
EN BIOTECNOLOGÍA

Tesis: CONVERSIÓN BIOTECNOLOGICA DE ASERRÍN DE PINO EN
AZÚCARES FERMENTABLES

Campo de estudio: Biotecnología

Datos personales:

Nacido en Cd. Nezahualcoyotl, Estado de México, el 3 de Diciembre de 1951, hijo de Ernesto López Castañeda y Juana Miranda Uriostegui

Educación:

Egresado de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, habiendo obtenido el grado de Ingeniero Bioquímico en 1990. Egresado del Instituto tecnológico de Durango, habiendo obtenido el grado de Maestro en Ciencias en Ingeniería de Alimentos en el año 2000.

Experiencia profesional:

Maestro de tiempo parcial en la Escuela Nacional de Ciencias biológicas de Enero de 1975 a Diciembre de 1976. Maestro de tiempo completo del Instituto Tecnológico Agropecuario Número uno de Durango, de Enero de 1987 a Junio de 1981. Maestro de Tiempo completo de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Juárez del estado de Durango, de Junio de 1981 a Marzo de 1983. Maestro de tiempo completo de Marzo de 1983 a la Fecha en el Instituto Tecnológico de Durango. Del 2002 a la Fecha con el nombramiento de Profesor Investigador. Pertenezco a la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería (SMBB) del 2005 a la fecha y a la Asociación Mexicana de Ciencia de de los Alimentos (AMECA), como miembro fundador. He publicado cuatro artículos y dos capítulos de libro.

Estimado Dr. Javier López Miranda

Por medio del presente y a nombre del Dr. Rafael Villalobos Pietrini, editor de la Revista Internacional de Contaminación Ambiental, tengo el agrado de comunicarle que su trabajo OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE OBTENCIÓN ENZIMÁTICA DE AZÚCARES FERMENTABLES A PARTIR DE ASERRÍN DE PINO fue ACEPTADO para su publicación en el Número 2, Volumen 25 correspondiente al año 2009. Es indispensable que el trabajo sea leído por un corrector de estilo en tanto notamos deficiencias en las citas, la lista de referencias y errores ortotipográficos a lo largo del texto; si lo requiere, nuestros correctores (galleyproof@gmail.com) le pueden ofrecer los servicios editoriales correspondientes.

Le solicitamos que envíe a la brevedad la versión final del trabajo, así como el título resumido en español para cabeceras y el título completo en inglés para la tabla de contenidos.

Anexamos el documento "Cesión de derechos", del cual le pedimos anotar lugar y fecha, así como nombre y adscripción del responsable del trabajo en el documento; una vez hechos los cambios, es necesario que lo imprima en papel membretado de la institución correspondiente, lo firme y nos envíe una copia digital en formato pdf.

Si requiere una carta de aceptación certificada, por favor háganoslo saber para hacerle llegar dicho documento.

Esperando que tenga muy buena tarde,
Oliver Davidson Vejar
Asistente Editorial
Revista Internacional de Contaminación Ambiental

<http://www.atmosfera.unam.mx/editorial/rica.html>



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

CENTRO DE CIENCIAS DE LA ATMOSFERA

CIRCUITO EXTERIOR, CIUDAD UNIVERSITARIA
C.P. 04510 MEXICO, D.F. MEXICO

REVISTA INTERNACIONAL DE CONTAMINACIÓN AMBIENTAL

Octubre 14 de 2008

Dr. Javier López Miranda
Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica
Instituto Tecnológico de Durango
Felipe Pescador 1830 Ote.
34080
Durango, Durango
México
Presente

Estimado Dr. Javier López Miranda

Por medio de la presente tengo el agrado de comunicarle que su trabajo OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE OBTENCIÓN ENZIMÁTICA DE AZÚCARES FERMENTABLES A PARTIR DE ASERRÍN DE PINO, bajo la autoría de Javier López Miranda, Nicolás Soto Cruz, Olga Rutiaga Quiñones, Hiram Medrano Roldán y Katuska Arévalo Niño, fue ACEPTADO para su publicación en el Número 2, Volumen 25, correspondiente al año 2009, de la Revista Internacional de Contaminación Ambiental.

Atentamente

Dr. Rafael Villalobos Pietrini
Editor

OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE OBTENCIÓN ENZIMÁTICA DE AZÚCARES FERMENTABLES A PARTIR DE ASERRÍN DE PINO

Javier LÓPEZ-MIRANDA^{1,2}, Nicolás O. SOTO-CRUZ¹, Olga M. RUTIAGA-QUIÑONES¹, Hiram MEDRANO-ROLDÁN¹, Katuska ARÉVALO-NIÑO²

¹Instituto Tecnológico de Durango, Felipe Pescador 1830 Ote., Col. Nueva Vizcaya, Durango, Dgo., México, jlopez@itdposgrado-bioquimica.com.mx

²Universidad Autónoma de Nuevo León

Palabras clave: hidrólisis enzimática, aserrín de pino, pretratamiento, azúcares fermentables.

RESUMEN

Con el propósito de aprovechar un recurso que en la actualidad es un desecho contaminante generado durante el aserre de la madera en Durango, México, se probaron los métodos de pretratamiento alcalino, ácido y explosión con vapor a temperatura de autoclave, para realizar la hidrólisis enzimática de aserrín de pino obtenido de tres aserraderos de la Ciudad de Durango y recuperar los azúcares contenidos en él. Se encontró que el pretratamiento con NaOH a 120 °C proporciona mejores resultados que los tratamientos con ácido sulfúrico diluido y por explosión con vapor a 121 °C. Se optimizó el pretratamiento alcalino por el método de superficie de respuesta. Los resultados muestran que la concentración óptima de azúcares reductores, con un valor de 48 %, se obtuvo después de un pretratamiento con 8 % de NaOH durante 85 minutos a 120 °C, a un pH de hidrólisis de 4.5, durante 240 h, con una carga enzimática de 25 UPF/g de carbohidratos totales. Por comparación con los resultados reportados en la literatura, se encuentra que el procedimiento obtenido es susceptible de ser utilizado para el aprovechamiento de este recurso.

32

ABSTRACT

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

INTRODUCCIÓN

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

This paper discusses the use of an industrial residue to reduce the pollution produced at sawmills in Durango, Mexico. Pine sawdust was alkali, acid and vapor pretreated in order to make an enzymatic hydrolysis of the sawdust coming from three different sawmills in the city of Durango and therefore recover the fermentable sugar present in the sawdust. The alkaline pretreatment at autoclave temperature of 120°C delivers the best results compared to the sulfuric acid pretreatment and steam explosion at 121°C. The alkaline pretreatment was optimized by the use of the surface response method. The results show that the highest sugar yield happened at concentrations of 8 % NaOH at 120°C for 85 min and a hydrolysis at pH 4.5 for 240 h, at an enzyme concentration of 25 FPU/g of total carbohydrates. The results show that the method used may be applied to take advantage of the sawdust.

El aserrín es un producto altamente estable con escasas alternativas de uso; su acumulación constituye un serio problema de contaminación en los suelos en que se deposita (Starbuck 1997). El aserrín puede causar enfermedades como asma, bronquitis crónica y otros problemas respiratorios asociados con alergias (Malström *et al.* 1999); también puede causar dermatitis, ronchas, cánceres pulmonares, gastrointestinales y nasales (Seguros de Texas 2004). Tradicionalmente se ha usado la combustión como alternativa para reducir la acumulación, pero su quema, además de ser ilegal, contribuye a la emisión a la atmósfera de más de 200 compuestos orgánicos potencialmente peligrosos (Wolfgang *et al.* 1998), tales como hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), que son potencialmente mutagénicos y carcinogénicos (Claessens *et al.* 1987, Ramdahl y Becher 1982).

Por otra parte, tanto el aserrín como los demás desperdicios de la explotación de las maderas suaves pueden ser utilizados como materia prima para la producción de etanol combustible y otros químicos (Palonen

et al. 2004) por ser los materiales lignocelulósicos dominantes en el hemisferio norte (Galbe y Zacchi 2002). En México, la industria del aserrío genera alrededor de 0.35 m³ de aserrín de pino por m³ de madera (SEMARNAP 2000), lo cual representa en promedio 206,000 m³ al año (INEGI 2008). Considerando que su densidad promedio es de 500 kg/m³ (Valencia 1999), esta producción equivale a 103,000 ton anuales, a partir de los cuales se podría obtener alrededor de 33X10⁶ l de etanol combustible. No obstante, la mayor limitante para la producción de etanol combustible a partir de aserrín es la recuperación de los azúcares que contiene y ésta a su vez está determinada por el procedimiento de hidrólisis que se utilice (ácido o enzimático). El procedimiento enzimático está limitado por la presencia de lignina y la cristalinidad de la celulosa (Millet y Baker 1975, Kent y Chang 1981, Marten *et al.*, 1996, Schell *et al.* 2003, Åkerholm y Salmén 2001 y 2002, McLean *et al.* 2002), por ello se han venido utilizando diversos procedimientos de pretratamiento, entre los que destacan el alcalino, el ácido y la explosión con vapor (Schultz y Burns 1990, Marten *et al.* 1996, Åkerholm y Salmén 2001 y 2002). Cada uno produce cambios particulares en las materias primas; así, el pretratamiento con ácido diluido hidroliza principalmente a las hemicelulosas, dejando una estructura porosa formada principalmente por celulosa y lignina, la cual es más accesible a la acción de las enzimas (Wyman 1994). La explosión con vapor rompe la estructura del material y aumenta la accesibilidad de la celulosa al ataque enzimático (Bender 1979, Shimizu *et al.* 1994, Gregg y Saddler 1996) y el pretratamiento con hidróxido de sodio (NaOH) rompe los enlaces lignina-carbohidrato, retira parte de la lignina y de las hemicelulosas, abre las estructuras del material, incrementa el área interfacial y reduce el grado de polimerización y cristalinidad de la celulosa, favoreciendo la sacarificación enzimática de la misma (Tuor *et al.* 1995). De acuerdo con Wyman *et al.* (2005), la biomasa lignocelulósica deberá ser pretratada para elevar los rendimientos; no obstante, éste es uno de los pasos más costosos, de manera que deberá prestársele particular

atención a fin de ganar ventaja de esta operación. En 1977, Martínez *et al.* encontraron que es posible producir cambios muy similares en la composición química del sustrato lignocelulósico durante el pretratamiento, utilizando diferentes combinaciones de las principales variables de operación (temperatura, tiempo y concentración). Por lo anterior, el presente trabajo tiene como objetivo identificar y optimizar las condiciones de pretratamiento e hidrólisis enzimática del aserrín de pino, con el propósito de utilizar un material considerado un contaminante potencialmente riesgoso, como materia prima para la obtención de azúcares fermentables susceptibles de ser utilizados en la producción de etanol combustible.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo y caracterización de la materia prima

Las muestras fueron colectadas de tres aserraderos de la ciudad de Durango, tamizadas con un tamaño de partícula comprendido entre las mallas 20 y 40, y almacenadas a temperatura ambiente. Se determinó por cuadruplicado su contenido de humedad (TAPPI T 258 om-89), extraíbles (TAPPI T 204 om-88), cenizas (TAPPI T 211 om- 85) y lignina (TAPPI T 222 om-88). El contenido de carbohidratos totales se obtuvo por cálculo (100-humedad-extraíbles-cenizas-lignina).

Selección del método de pretratamiento

El aserrín se extrajo durante 24 h con etanol al 95 %, se lavó con agua destilada, se secó a 70 °C durante 24 h y se almacenó a temperatura ambiente. Se probaron los métodos de pretratamiento con NaOH, H₂SO₄ y explosión con vapor. El material pretratado se sometió a hidrólisis enzimática, utilizando para ello un preparado comercial, Celluclast 1.5L proporcionado por NOVOZYM de México. Se determinó el contenido de azúcares reductores en el hidrolizado por el método de Miller (1959). Los resultados se multiplicaron por 0.9 para corregir el agua añadida a la

molécula durante la hidrólisis de la celulosa. Se calculó el porcentaje de sacarificación respecto a los azúcares potencialmente hidrolizables (ecuación 1). Las condiciones experimentales se muestran en la **figura 1**. Se utilizó el diseño experimental 2^k factorial, con k igual a 3 para los pretratamientos ácido y alcalino, e igual a 2 para el pretratamiento por explosión con vapor. Todos los experimentos se realizaron por duplicado. Los resultados se analizaron por el procedimiento de ANOVA y las mejores condiciones de pretratamiento se identificaron por el método estadístico de la diferencia mínima significativa (LSD). Las mejores condiciones de pretratamiento e hidrólisis obtenidas para cada uno de los procedimientos probados se compararon entre sí mediante la prueba de *t* para muestras dependientes (Montgomery 1991). Se seleccionó el mejor procedimiento y se optimizó por el método de superficie de respuesta (Montgomery 1991, Soto-Cruz *et al.* 1999, Ge *et al.* 2002). Los resultados se analizaron con el software Statistica 5.5 de Statistics INC.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización química de la materia prima

La composición química del aserrín (**Cuadro I**) es similar a la reportada por FAO (1997) para madera, Lee (1992) para materiales lignocelulósicos y Sjöström (1981) y Mosier *et al.* (2005) para madera blanda. Las diferencias encontradas dependen del tipo de biomasa, el lugar de crecimiento, los fertilizantes usados, el tiempo de cosecha y las condiciones de almacenamiento (de Boer y den Uil 1997).

Selección del método de pretratamiento

El análisis de varianza de los resultados de la hidrólisis enzimática del aserrín de pino pretratado con NaOH (**Cuadro II**) mostró que las variables probadas y sus interacciones (con excepción de la interacción tiempo de pretratamiento-tiempo de hidrólisis), influyen significativamente ($p < 0.05$)

sobre los rendimientos de hidrólisis. El método de la diferencia mínima significativa (LSD) muestra que es posible obtener rendimientos de hidrólisis similares bajo condiciones diferentes de pretratamiento e hidrólisis y que las condiciones de pretratamiento que produjeron el mejor rendimiento (33.2624 ± 0.24 %) son 3 % de NaOH, 90 minutos de pretratamiento a 121 °C y 168 h de hidrólisis a un pH de 4.5 con una carga enzimática de 25 UPF/g de celulosa potencial (**Cuadro II**). Este rendimiento es 1.5 veces menor que el reportado por Soto *et al.* (1994) para cascarilla de girasol pretratada con 0.5 % de NaOH, a 120 °C durante 90 minutos, e hidrolizada con Celluclast suplementada con Novozym 188, para una carga enzimática de 25 UPF/g de celulosa. Por otra parte, es 1.75 veces menor que la reportada por Latif *et al.* (1994), quienes pretrataron pasto Kallar con NaOH al 2 % a 121 °C e hidrolizado con un concentrado enzimático obtenido de *Clostridium thermofillus*; la hidrólisis se efectuó a 60 °C durante 90 h. Adicionalmente, es 1.85 veces mayor que la reportada por estos mismos autores para el mismo sustrato sometido a las mismas condiciones de pretratamiento, pero hidrolizado con un concentrado enzimático obtenido de una cepa autóctona de *T. reesei* (VTT-D-79125).

Para el pretratamiento con H_2SO_4 , el análisis de varianza muestra que el tiempo de hidrólisis y las interacciones (concentración de H_2SO_4 , tiempo de pretratamiento y concentración de H_2SO_4 , tiempo de pretratamiento, tiempo de hidrólisis) influyen significativamente ($p < 0.05$) sobre los rendimientos de azúcar. La comparación entre tratamientos dentro de este grupo (LSD, $p < 0.05$) señala que los mejores resultados (9.59 ± 0.39 %) se obtuvieron para las siguientes condiciones de hidrólisis: $H_2SO_4 = 2$ %, $t_p = 40$ min a 121 °C y $t_h = 240$ h, pH = 4.5, con una carga enzimática de 25 UPF/g de celulosa potencial. Este rendimiento es dos veces menor que el reportado por Saha *et al.* (2005) para cascarilla de arroz pretratada durante 1 h a 121 °C con H_2SO_4 al 1 %, hidrolizada con una mezcla de enzimas comerciales (Celluclast y Novozym 188), adicionadas con Twen 80, a pH 5.0, durante

186 72 h. A su vez, es 5.5 veces menor que la obtenida de la hidrólisis de
187 desperdicios de papel pretratado con 1.1 % de H₂SO₄ a 160 °C por 10
188 minutos, con 10 g/L de un concentrado enzimático de *T. reesei* (con una
189 potencia de 0.184 FPU/mg), adicionada con Tween 80 y Tween 20 como
190 surfactantes (Wu y Kwang 1998). Kadam *et al.* (2004) pretrataron rastrojo
191 de maíz con H₂SO₄ a 50 °C y obtuvieron una concentración de glucosa de
192 52 % en el material pretratado. Por otra parte, Rosgard *et al.* (2006)
193 hidrolizaron paja de cebada pretratada por explosión con vapor a 170 °C,
194 después de haberla humectado con H₂SO₄ al 1 % (v/v), con una mezcla de
195 Celluclast y Novozym 188, obteniendo una conversión del 95 % en 6 h y
196 de casi el 100 % después de 48 h de hidrólisis. Estas diferencias pueden
197 atribuirse al tipo de sustrato o a las diferentes condiciones utilizadas
198 durante la experimentación, aunque es definitivo que la composición del
199 preparado enzimático y la presencia de surfactantes afectan
200 benéficamente a la sacarificación enzimática (Wu y Kwang 1988). El
201 pretratamiento con ácido sulfúrico remueve a las hemicelulosas de manera
202 casi completa e incrementa el rendimiento de la glucosa proveniente de la
203 hidrólisis enzimática de la celulosa (Wyman *et al.* 2005); sin embargo, es
204 claro que la eficacia del método depende del material a hidrolizar, así
205 como de las condiciones del pretratamiento y la hidrólisis. Podemos decir
206 que para el aserrín de pino, en las condiciones probadas, el pretratamiento
207 con ácido diluido es poco efectivo para hidrolizar la celulosa que contiene.
208 Para el pretratamiento por explosión con vapor, el análisis de varianza
209 muestra que los tratamientos probados y su interacción producen
210 resultados estadísticamente diferentes. La comparación entre tratamientos
211 del mismo grupo (LSD, $p < 0.05$) muestra que el rendimiento máximo
212 (17.875 ± 1.49 %) de azúcares reductores se obtuvo para un tiempo de
213 pretratamiento de 90 minutos a 121 °C y un tiempo de hidrólisis de 240 h,
214 a un pH de 4.5, con una carga enzimática de 25 UPF/g de celulosa
215 potencial. Palmarola *et al.* (2004) reportan que la hidrólisis de una mezcla
216 de fibra de la industria de almidón (libre de almidón) con 5 % de agua

desionizada y calentada a temperaturas entre 110-210 °C durante 20 y 60 minutos (pretratada por explosión con vapor), e hidrolizada con Celluclast 1.5 L y Ultraflo L de Novozyme, a pH de 5 durante 48 h, a 200 rpm, produjo rendimientos dos veces mayores que para el aserrín de pino en 48 h de hidrólisis. Es claro que un rendimiento del 17.87 % sigue siendo bajo, por lo que el procedimiento de explosión con vapor utilizado no es recomendable para el procesamiento del aserrín de pino.

Es importante mencionar que los contenidos de lignina en el material pretratado son muy parecidos a los del aserrín sin tratar (26.58 ± 0.37 %) y que la máxima delignificación se obtuvo para el pretratamiento con NaOH al 1 %, mientras que la concentración máxima de azúcares reductores se obtuvo para el pretratamiento con NaOH al 3 %. Lo anterior hace suponer que las modificaciones ocurridas en el material pretratado tienen una influencia mayor sobre los rendimientos de sacarificación que el contenido mismo de lignina.

Selección del método de pretratamiento

Como puede observarse, los rendimientos obtenidos durante la hidrólisis enzimática del aserrín de pino pretratado con NaOH fueron 3.5 veces mayores que los logrados por el tratamiento con H_2SO_4 y 1.86 veces mayores que el obtenido por el procedimiento por explosión con vapor. La comparación estadística de los rendimientos de hidrólisis máximos se compararon con la prueba de t para muestras dependientes, y se encontró que son estadísticamente diferentes ($p > 0.05$), por lo cual se eligió al pretratamiento con NaOH para su optimización.

Optimización del proceso de hidrólisis enzimática del aserrín de pino pretratado con NaOH

Para la definición del espacio experimental se determinaron las tendencias de optimización mediante un ajuste lineal de los resultados (Ecuación 1), las cuales están especificadas por las Ecuaciones 2 y 3. El espacio

experimental explorado se obtuvo para incrementos de la concentración de NaOH de 0.75 % en la dirección de tendencia (Cuadro III).

250

$$\text{Ared} = -5.580 + 0.130 \cdot t_p + 0.380 \cdot C + 0.086 \cdot T + 0.052 \cdot t_h - 1.495 \cdot \text{pH} \quad (1)$$

$$0.1251 \cdot t_p = 0.3785 \cdot C \quad (2)$$

$$0.0521 \cdot t_h = 0.3785 \cdot C \quad (3)$$

254

El experimento se realizó en dos etapas. El análisis de varianza de la primera etapa mostró que la temperatura de hidrólisis dejó de tener influencia significativa después de 240 °C; por ello, la segunda se realizó a temperatura constante (240 °C). Los resultados de esta última mostraron que los rendimientos de hidrólisis son muy parecidos entre sí para las condiciones probadas, por lo que se procedió a la realización de un experimento final mediante un diseño central compuesto en la región definida en la segunda etapa. Los resultados de ésta se presentan en la **figura 2**, donde se muestra que la producción óptima de azúcares reductores (48 %) fue obtenida para una concentración de NaOH del 8 % y un tiempo de pretratamiento de 87 minutos a 120 °C, con un tiempo de hidrólisis 240 h, a pH de 4.5 y una carga enzimática 25 UPF/g de celulosa. Los resultados obtenidos en el presente trabajo fueron superiores a los reportados por Lee *et al.* (1995), quienes pretrataron madera por explosión con vapor a 121°C durante 3 min, para obtener un rendimiento de glucosa de 4 %; tales resultados son muy similares a los reportados por Yang *et al.* (2002) para astillas de madera pretratada con 0.4 % de NaOH a 60 °C, y cuyos rendimientos obtenidos fueron de 45 % respecto al material pretratado y ligeramente inferiores (2 %) a los reportados por Latif *et al.* (1994) para pasto Kallar. Lo anterior permite afirmar que bajo las condiciones especificadas, este material puede ser utilizado como materia prima para la obtención de ácidos orgánicos, pigmentos y etanol combustible. No obstante, las condiciones de pretratamiento obtenidas en el presente trabajo son más severas que la mayoría de las reportadas en

la literatura, por ello es recomendable buscar la reutilización del hidróxido de sodio, a fin de mejorar la viabilidad económica del proceso y eliminar las cargas contaminantes que produciría su descarga al ambiente.

CONCLUSIONES

El pretratamiento alcalino es el que más favorece a la hidrólisis enzimática, ya que produce los rendimientos más altos de azúcares reductores. Con este pretratamiento se obtiene un rendimiento de sacarificación 134 % mayor que con el pretratamiento con ácido sulfúrico y 246 % mayor que el de explosión con vapor. La optimización del tratamiento alcalino por el método de superficie de respuesta mostró que las condiciones optimas son: tiempo de pretratamiento de 85 minutos, concentración de NaOH al 8 %, temperatura de pretratamiento de 120 °C, tiempo de hidrólisis de 240 h. Bajo estas condiciones se obtuvo un rendimiento de 48 % de azúcares reductores respecto a los azúcares potencialmente hidrolizables. Estos resultados permitirán el desarrollo de una tecnología para el aprovechamiento del aserrín de pino en la generación de un combustible alternativo para la industria automotriz y eliminarán un contaminante del suelo potencialmente riesgoso para la salud de los habitantes del bosque, al igual que la necesidad de quemarlo a cielo abierto para disponer de él.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue financiado por el COSNET (Clave del proyecto: 2458-P). JLM agradece al CONACYT-México por la beca otorgada para los estudios de doctorado y a NOVOZYME-México por proveer el complejo enzimático utilizado.

REFERENCIAS

Akerholm M. y Salmen L. (2001). Interactions between wood polymers studied by dynamic FT-I spectroscopy. Polymer 42, 963-969.

310 Akerholm M. y Salmen L. (2002). Dynamic FTIR spectroscopy for
311 carbohydrate analysis of wood pulps. J. of pulp and paper sc. 28, 245-249.

312 Bender, R. (1979). U.S.A. Patent, 4,136,297.

313 Claessens H.A. y Lammerts van Bueren L.G.D. (1987). An off-line two-
314 dimensional analytical procedure for the determination of polycyclic aromatic
315 hydrocarbons in smoke aerosol. J. High Resolut. Chromatogr. & Chromatogr.
316 Commun. 10, 342-347.

317 De Boer A.J. y Den Uil H. (1997). An evaluation of three routes for the
318 production of liquid fuels from biomass. Fuel and Energy Abstracts 38, 326-
319 326.

320 EPA (1998). Introduction to: CERCLA and EPCRA Release Reporting
321 Requirements (CERCLA §103 and EPCRA §304).

322 Galbe M. y Zacchi G. (2002). A review of the production of ethanol from
323 softwood. Appl. Microbiol. Biotechnol. 59, 618-628.

324 Ge Y., Ni Y., Yan H., Chen Y. y Cai T. (2002). Optimization of the
325 supercritical fluid extraction of natural vitamin E from wheat germ using
326 response surface methodology. J. of Food Sc. 67, 239-243.

327 Gregg D. y Saddler J. N. (1996) A technoeconomic assessment of the
328 pretreatment and fractionation steps of a biomass-to-ethanol process. Appl.
329 Biochem. Biotechnol. 57/58, 711-727.

330 Hamelinck C.N., van Hooijdonk G., Faaij A. (2005). Ethanol from
331 lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and
332 long term. Biomass and Bioenergy. 28, 384-410.

333 Holtzapple M.T. y Davison R.R. (1999). Methods of biomass pretreatment.
334 USA Patent. 5,865,898.

335 INEGI (2008). Agenda Estadística de los Estados Unidos Mexicanos.
336 http://www.inegi.gob.mx/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/integracion/pais/agenda/2008/Agenda_2008.pdf
337
338 Kirk T.K. y Chang H.M. (1981). Potential applications of bio-lignilolytic
339 systems. *Enz. Microb. Technol.* 3, 189-196.

340 Lee J. M. (1992). *Biochemical Engineering*. Prentice Hall, New Jersey,
341 U.S.A., 321 p.

342 Latif F., Rajoka M.I. y Malik K.A. (1994). Saccharification of leptochloa fusca
343 (Kallar grass straw) using thermostable cellulases. *Biores. Technol.* 30, 107-
344 111.

345 Malström K., Savolainen J. y Terho E. O. (1999). Allergic alveolitis from pine
346 sawdust. *Allergy.* 54, 526-533.

347 Marten M.R., Velkovska S., Khan S.A. y Ollis D.F. (1996). Rheological, mass
348 transfer, and mixing characterization of cellulase-producing *Trichoderma*
349 *reesei* Suspensions. *Biotechnol. Prog.* 12, 602-611.

350 Martinez J.M., Reguant J., Montero M.A., Montané D., Salvadó J. y Farriol X.
351 (1997). Hydrolytic pretreatment of softwood and almond shells. Degree of
352 polymerization and enzymatic digestibility of cellulose. *Ind. Eng. Chem. Res.*
353 36, 688-696.

354 McLean B.W., Boraston A.B., Brouwer D., Sanaie N., Fyfe C.A., Warren R.,
355 Kilburn D.G. y Haynes C.A. (2002). Carbohydrate-binding modules recognize
356 fine substructures of cellulose. *J. of Biol. Chem.* 277, 50245-50254.

357 Miller G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of
358 reducing sugars. *Anal. Chem.* 31, 426-428.

359 Millet M.A., Baker A.J. y Satter L.D. (1975). Pretreatments to enhance
 360 chemical, enzymatic, and microbiological attack of cellulosic materials.
 361 Biotechnol. & Bioeng. Symp. 5, 192-219.

362 Montgomery D.C. (1991). *Diseño y Análisis de Experimentos*. Editorial
 363 Iberoamericana. México, D.F., 704 p.

364 Mosier N., Wyman C., Dale B., Elander R., Lee Y.Y., Holtzapple M. y
 365 Ladisch M. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of
 366 lignocellulosic biomass. Biores. Tech. 96, 673-686.

367 Palonen H., Tjerneld F., Zacchi G. y Tenkanen M. (2004). Adsorption of
 368 *Trichoderma reesei* CBH I and EG II and their catalytic domains on steam
 369 pretreated softwood and isolated lignin. J. of Biotech. 107, 65-72.

370 Ramdahl T. y Becher G. (1982) Characterization of polynuclear aromatic
 371 hydrocarbon derivatives in emissions from wood and cereal straw
 372 combustion. Anal. Chim. Acta 144, 83-91.

373 Saha B.C., Iten L.B., Cotta M.A., y Wu V.Y.. (2005). Dilute acid pretreatment,
 374 enzymatic saccharification, and fermentation of rice Hulls to ethanol.
 375 Biotechnol. Prog. 21, 816-822.

376 Semarnap. (2000). Texto Guía forestal. Secretaría del Medio Ambiente
 377 Recursos Naturales y Pesca, México, D. F. 105 p.

378 Shimizu K., Sudo K., Ono H., Ishihara M. y Fujii T. (1994). Total utilization of
 379 wood components by steam explosion pretreatment. Trans. Mater. Res. Soc.
 380 Jpn. 18A, 491-496.

381 Schell D.J., Farmer J., Newman M. y McMillan J.D. (2003). Dilute-sulfuric
382 acid pretreatment of corn stover in pilot-scale reactor. Appl. Biochem. and
383 Biotech. 105, 69-85.

384 Seguros de Texas (2004). Peligros y Control del Aserrín. División de
385 Compensación para Trabajadores (TDI/DWC). Pub No. HS98-134B (9-04)

386 Sjöström E. (1981). *Wood Chemistry: Fundamentals and Applications*.
387 Academic Press, San Diego California, USA, 293 p.

388 Soto-Cruz Ó., Saucedo-Castañeda G., Pabls-Hach J.L., Gutiérrez-Rojas M.
389 y Favela-Torres E.. (1999). Effect of substrate composition on mycelial
390 growth of *Pleurotus ostreatus*. An analysis by mixture and response surface
391 methodologies. Proc. Biochem. 35, 127-133.

392 Starbuck, C. (1997). Producción y uso de composta de aserrín de avena y
393 estiércol. III Simposium Internacional y IV Reunión nacional de agricultura
394 sostenible. Universidad de Guadalajara, 16 a 19 de Noviembre, Guadalajara
395 Jalisco, 96 p.

396 TAPPI methods (1991). Fibrous materials and Pulp Testing T1-T270, Paper
397 and Paperboard Testing T400-T550. Vol. 1.

398 Tuor U., Winterhalter K. y Fiechter A. (1995). Enzymes of white-rot fungi
399 involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. J.
400 of Biotech. 411, 1-17.

401 Valencia S. y López F. (1999). Variación de la densidad de la madera dentro
402 y entre árboles de *Pinus rudis* Endl., en Sierra Las Alazanas, Arteaga, Coah.
403 Foresta-AN. Nota Técnica No. 1. UAAAN. Saltillo, Coah. 17 p.

404 Wyman C.E. (1994). Ethanol from lignocellulosic biomass: technology,
405 economics, and opportunities. *Biores. Tech.* 50, 3-15.

406 Yang B., Boussaid A., Mansfield S., Gregg D.J. y Saddler J.N. (2002). Fast
407 and efficient alkaline peroxide treatment to enhance the enzymatic
408 digestibility of steam-exploded softwood substrates. *Biotech. and Bioeng.* 77,
409 678-684.

410

411
412
413

414
415
416
417

Cuadro 1. Composición química del aserrín de pino en comparación con las reportadas por Sjöström (1981), Lee (1992), FAO (1997) y Mosier *et al.* (2005).

Componente	Experimentales (%)	FAO ¹ (%)	Lee ² (%)	Sjöström ³ (%)	Mosier <i>et al.</i> ⁴ (%)
Celulosa	-	40 – 55	30 – 60	40 – 45	46.4
Hemicelulosa	-	20 – 35	30 - 60	20 – 30	8.8
Carbohidratos totales	55.233±0.74	60 - 90	60 - 90	60- 75	55.2
Lignina	26.58±0.41	25 – 30	10 – 30	26 – 32	29.4
Extraíbles	24.41±0.36	5 – 20	10 – 20	--	--
Cenizas	0.68±0.02	0.2 – 2.0	--	--	--

¹madera, ²materiales lignocelulósicos y ^{3,4}maderas blandas.

418

419 Cuadro 2. Rendimientos de sacarificación del aserrín de pino para los pretratamientos
420 evaluados.

Pretratamiento	Experimento	Concentración de reactante (%)	Tiempo de Pretratamiento (min.)	Tiempo de Hidrólisis (h)	Azúcares reductores (%)
Alcalino	A1	1	30	72	5.02±0.26
	A2			168	6.89±0.10
	A3		90	72	11.50±0.19
	A4			168	22.40±0.76
	A5	3	30	72	5.21±0.28
	A6			168	8.11±0.23
	A7		90	72	13.12±0.64
	A8			168	33.26±0.24
Ácido	B1	1	40	72	7.92±0.93
	B2			240	12.97±0.39
	B3		120	72	12.11±1.27
	B4			240	7.31±1.08
	B5	2	40	72	9.18±1.20
	B6			240	14.23±1.80
	B7		120	72	12.96±1.37
	B8			240	8.18±1.16
Explosión con Vapor	E1	0	30	72	6.24±0.54
	E2			240	8.15±0.88
	E3		90	72	4.83±0.15
	E4			240	9.62±2.05

421 Los pretratamientos fueron realizados a 120 °C. La hidrólisis enzimática se efectuó a pH 4.5, con una
422 carga enzimática de 25 UPF/g de carbohidratos totales en el aserrín. Estos experimentos fueron realizados
423 por duplicado.

424

425

426

427

428

Cuadro 3. Espacio experimental para incrementos de NaOH de 0.75 % en la dirección de
tendencia.

Etapa	NaOH (%)	Condiciones	
		Tp (min)	Th (h)
1	2 - 5,75	60 – 97.80	120 – 215.34
2	5.75 – 7.50	97.8 – 137.40	240
3	7.5 – 8.71	77.95 – 92.05	240

429

430

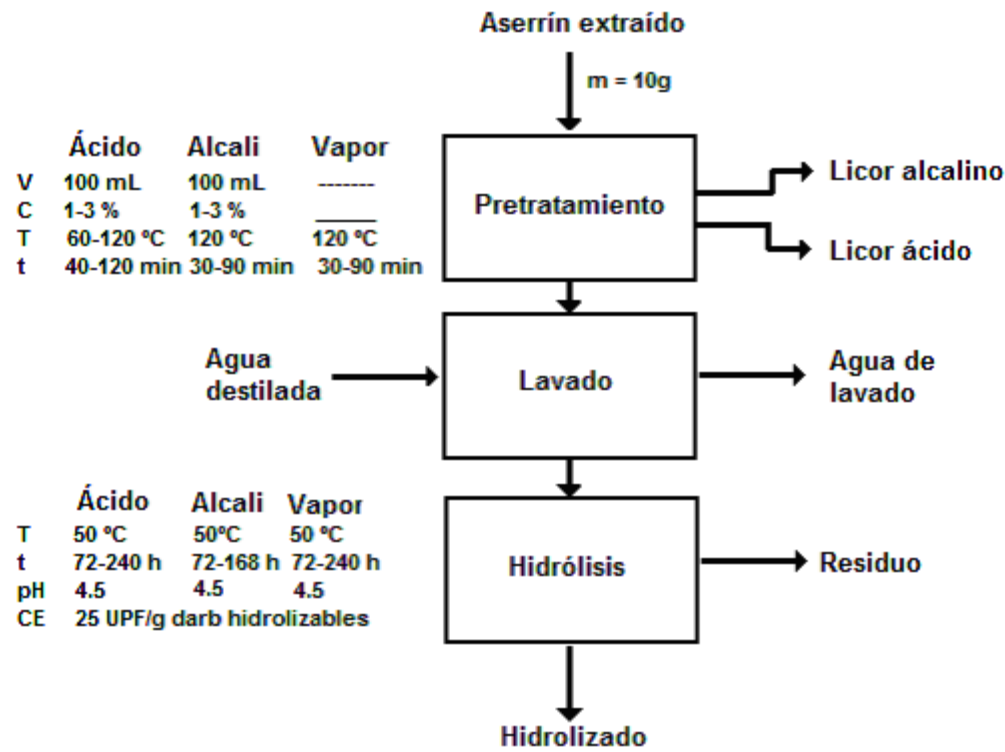
431

432

433

434
435
436
437
438
439

Figura 1. Selección del procedimiento de hidrólisis. Procedimiento experimental.



440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451

$$z = -791.812 + 162.978x + 4.017y - 11.07x^2 + 0.21x^2y - 0.033y^2y$$

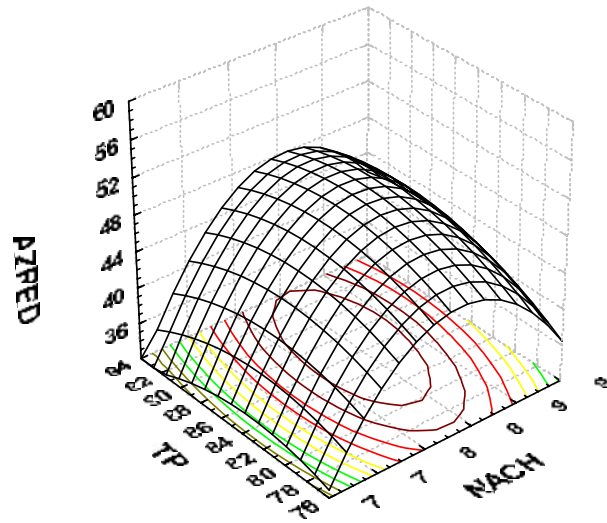


Figura 2. Gráfico del diseño central compuesto en la región del segundo cambio de tendencia.